

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Martin Pokorný

Nové přístupy ke zmírnění myokardiální atrofie po mechanickém odlehčení

Experimentální studie heterotopické transplantace srdce u laboratorního potkana

New approaches to myocardial atrophy attenuation after mechanical unloading

Experimental study of heterotopic heart transplantation in rats

Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Jiří Malý, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 7. 2. 2019

MUDr. Martin Pokorný

Podpis

Identifikační záznam

POKORNÝ, Martin. Nové přístupy ke zmírnění myokardiální atrofie po mechanickém odlehčení. [New aproaches to myocardial atrophy attenuation after mechanical unloading]. Praha 2019. 108 str. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Fyziologický ústav.

Školitel: Malý, Jiří.

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval všem kolegům z Kliniky kardiovaskulární chirurgie a Centra experimentální medicíny, kteří se mnou po celou dobu projektu spolupracovali.

Jmenovitě bych chtěl poděkovat svému školiteli doc. MUDr. J. Malému, Ph.D. za trpělivé a odborné vedení a také prof. MUDr. I. Netukovi, Ph.D. a prof. MUDr. J. Pirkovi, DrSc. za podporu, díky které jsem se mohl práci věnovat.

Zvláštní dík patří prof. MUDr. L. Červenkovi, CSc. za odborné vedení experimentální části a cenné rady v průběhu celého studia. Velmi rád bych zde také poděkoval Ing. I. Mrázové za obětavou spolupráci při realizaci vlastních pokusů na zvířatech v Centru experimentální medicíny.

Úvodní prohlášení

Veškeré experimenty prováděné v rámci této práce byly schváleny Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Pro každou studii byl vypracován samostatný projekt pokusu, který byl schválen odbornou komisí na ochranu zvířat IKEM a příslušnou rezortní komisí MZ ČR dle platné legislativy.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
SOUHRN	4
ABSTRACT	5
KLÍČOVÁ SLOVA:	6
1. ÚVOD	7
1.1. Chronické srdeční selhání	7
1.2. Pokročilá chirurgická léčba pacientů v terminálním stádiu srdečního selhání	9
1.2.1. Ortotopická transplantace srdce	10
1.2.2. Mechanické srdeční podpory	13
1.2.2.1. Most k transplantaci srdce - Bridge to transplant	17
1.2.2.2. Most k rozhodnutí - Bridge to decision, Bridge to bridge	18
1.2.2.3. Most k zařazení na čekací listinu - Bridge to candidacy	18
1.2.2.4. Cílová léčba – Destination therapy	18
1.2.2.5. Most k zotavení - Bridge to recovery	19
1.3. Atrofie myokardu	20
1.3.1. Atrofie myokardu asociovaná s mechanickým odlehčením srdečních oddílů	20
1.3.2. Experimentální model – heterotopická transplantace srdce	22
1.4. Možnosti ovlivnění atrofie myokardu	26
1.4.1. Farmakologické metody ovlivnění atrofie myokardu	26
1.4.2. Mechanické způsoby ovlivnění srdeční atrofie	27
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	31
3. STUDIE Č. 1	33
Sledování rozvoje atrofie myokardu po heterotopické transplantaci srdce u laboratorního potkana kmene <i>Lewis</i>	33
3.1. Úvod	33
3.2. Cíle studie	34
3.3. Metodika	34
3.4. Výsledky	40
3.5. Diskuze	55
3.6. Souhrn výsledků	58
4. STUDIE Č. 2	59
Metabolické ovlivnění atrofie myokardu po heterotopické transplantaci srdce u laboratorního potkana	59
4.1. Úvod	59
4.2. Cíle studie	60

4.3. Metodika	60
4.3.3. Experiment č. 1	61
Vliv izokalorické vysokosacharóзовé diety na tkáňovou koncentraci kyseliny palmitové, kyseliny palmitoolejové a kyseliny myristové u laboratorního potkana kmene Lewis	61
4.3.4. Experiment č. 2	63
Vliv zvýšené myokardiální koncentrace kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové na rozvoj atrofických změn po HTx srdce u laboratorního potkana kmene Lewis	63
4.4. Statistická analýza výsledků	66
4.5. Výsledky	66
4.6. Diskuze	75
4.7. Souhrn výsledků	78
5. STUDIE Č. 3	79
Mechanické ovlivnění atrofie myokardu po heterotopické transplantaci srdce u laboratorního potkana	79
5.1. Úvod	79
5.2. Cíl studie	81
5.3. Metodika	81
5.3.4. Statistická analýza výsledků	86
5.4. Výsledky	86
5.5. Diskuze	97
5.6. Souhrn výsledků	99
6. CELKOVÉ SHRnutí VÝSLEDKŮ	100
7. ZÁVĚR	101
8. LITERATURA	103
9. PUBLIKACE	109

Seznam použitých zkratk

CHSS	chronické srdeční selhání
LK	levá komora
VAD	mechanická srdeční podpora (ventricular assist device)
LVAD	levostranná mechanická srdeční podpora (left ventricle assist device)
RVAD	pravostranná mechanická srdeční podpora (right ventricle assist device)
BIVAD	biventrikulární mechanická srdeční podpora (biventricular assist device)
ACF	aorto-kavální píštěl
HW	hmotnost srdce (heart weight)
LVW	hmotnost levé komory (left ventricle weight)
RVW	hmotnost pravé komory (right ventricle weight)
TAH	kompletní srdeční náhrada (total artificial heart)
BW	tělesná hmotnost (body weight)
HTx	heterotopická transplantace srdce
MO	mimotělní oběh

Souhrn

Rozvoj srdeční atrofie, jako následek mechanického odlehčení srdce, který byl popsán u pacientů léčených dlouhodobými mechanickými srdečními podporami, představuje jednu ze zásadních překážek v cestě k zotavení myokardu.

Prvním cílem této práce bylo zhodnotit rozvoj srdeční atrofie u zdravého a selhávajícího myokardu po mechanickém odlehčení. Experimentálním modelem ke studiu mechanického odlehčení byla zvolena heterotopická transplantace srdce u laboratorního potkana. Srdeční selhání bylo experimentálně vyvoláno chronickým objemovým přetížením po vytvoření aorto-kavální píštěle. Druhým cílem této práce bylo zjistit, zda dietou navozené zvýšení koncentrací kyseliny myristové, palmitové a palmitoolejové v myokardu dokáže zmírnit průběh atrofických změn. Právě u těchto vybraných mastných kyselin byla již dříve prokázána schopnost navodit fyziologický růst myokardu. Třetím cílem této práce bylo zjistit, zda navýšení izovolumické zátěže heterotopicky transplantovaného srdce může ovlivnit rozvoj srdeční atrofie. Zvýšení izovolumické zátěže bylo dosaženo po implantaci nově navrženého intraventrikulárního expandéru. Rozvoj srdeční atrofie byl hodnocen jako váhový úbytek heterotopicky transplantovaného srdce v porovnání s hmotností srdce kontrolních skupin, a to 7, 14, 21 a 28 dní po heterotopické transplantaci. Simultánně byla hodnocena šířka kardiomyocytů a rozsah myokardiální fibrózy.

Mechanické odlehčení po heterotopické transplantaci srdce vedlo k signifikantnímu poklesu hmotnosti srdce a šířky kardiomyocytů ve všech sledovaných obdobích. Rozvoj srdeční atrofie po mechanickém odlehčení byl výrazně akcentován po heterotopické transplantaci selhávajícího myokardu. Bylo potvrzeno zvýšení myokardiální koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové jako důsledek izokalorické vysokosacharóзовé diety. Prezentované zvýšení koncentrací mastných kyselin však nikterak neovlivnilo trend rozvoje atrofických změn po heterotopické transplantaci srdce. Zvýšení izovolumické zátěže prostřednictvím trojramenného expandéru vedlo k signifikantní inhibici rozvoje srdeční atrofie, avšak pouze u heterotopicky transplantovaných srdcí po navození srdečního selhání.

Abstract

Cardiac atrophy, as a result of a long term mechanical unloading observed in patients treated with mechanical circulatory supports, represents a substantial obstacle in cardiac recovery.

The first aim of this thesis was to evaluate the course of unloading-induced cardiac atrophy in healthy and failing heart. Mechanical unloading was studied in an experimental model of heterotopic heart transplantation in rats. Heart failure was experimentally induced by chronic volume overload achieved by creation of aorto-caval fistula. The second aim of this thesis was to discover if dietary induced increase in fatty acids concentration in heart tissue, specifically myristic, palmitic and palmitoleic, that are believed to promote physiological heart growth, could attenuate the course of cardiac atrophy. The third aim of this thesis was to examine if increased isovolumic loading obtained by intraventricular implantation of newly designed spring expander would attenuate the development of cardiac atrophy. The level of cardiac atrophy was evaluated as the weight loss of the heterotopically transplanted heart compared to the control heart on days 7, 14, 21 and 28 after heterotopic transplantation. The cardiomyocyte width and the level of cardiac fibrosis was studied simultaneously.

Mechanical unloading following heterotopic heart transplantation caused significant decrease in heart weight and cardiomyocyte width in all the time end-points. The progression of unloading-induced cardiac atrophy was even more expressed in heterotopically transplanted failed hearts. The increase of above mentioned fatty acids after exposure to isocaloric high sucrose diet was confirmed. However, these increases were not associated with any change in the course of cardiac atrophy. The implantation of the spring expander significantly reduced the development of cardiac atrophy at all the time end-points, but only in the failing hearts.

Klíčová slova:

Srdeční selhání, srdeční atrofie, mechanické odlehčení srdce, heterotopická transplantace srdce u laboratorního potkana, mastné kyseliny, intraventrikulární expandér

Key words:

Heart failure, heart atrophy, mechanical unloading of the heart, heterotopic heart transplantation in rats, fatty acids, intraventricular expander

1.Úvod

1.1. Chronické srdeční selhání

Chronické srdeční selhání (CHSS) v současnosti představuje globální zdravotnický i sociální problém. Celosvětově postihuje více než 26 milionů obyvatel a to zejména v rozvinutých zemích, kde lze hovořit o nové epidemii naší doby (Savarese G. a Lund L. H., 2017). Prevalence srdečního selhání u dospělé populace činí ve vyspělých státech 2-3 % (Dunlay S. M. a Roger V. L., 2014). V zemích Evropské unie lze navíc předpokládat nárůst počtu nemocných až na dvojnásobek (Ponikowski P. et al., 2016). Výskyt CHSS se výrazně zvyšuje s věkem. Prevalence CHSS u osob do 50 let věku se v Evropské populaci pohybuje na 1,5-2 %. Prevalence CHSS u osob starších 70 let přesahuje 10 % (Savarese G. a Lund L. H., 2017). Závažnost problematiky CHSS podtrhuje nadále špatná prognóza pacientů. I přes výrazný pokrok ve farmakoterapii CHSS, resynchronizační terapii a chirurgické léčbě základních onemocnění, která vedou k rozvoji CHSS, se pětileté přežití pohybuje okolo 50 % a desetileté přežití pouze 27 % (Mosterd A. et al., 2001). Před érou moderní terapie srdečního selhání však prognóza pacientů trpících CHSS byla výrazně horší. Data získaná v průběhu let 1948-1988 v rámci Framinghamské studie totiž dokládají u pacientů postižených CHSS jednoleté přežití 57 % a pětileté přežití 25 % u mužů a 64 %, resp. 38 % u žen (Ho K. K. et al., 1993).

S příchodem pokročilé chirurgické léčby srdečního selhání lze předpokládat další výrazné zlepšení prognózy pacientů s CHSS. Dle registru pacientů s mechanickými srdečními podporami, dosahuje jednoleté přežití po implantaci levostranné mechanické srdeční podpory 81 % a dvouleté přežití 70 % (Kirklin J. K. et al., 2017). Jednoleté přežití pacientů po ortotopické transplantaci se pohybuje v rozmezí 85-90 % a medián přežívání pacientů po transplantaci srdce je 11 let (Chaudhry S. P. a Stewart G. C., 2016).

Chronické srdeční selhání lze definovat jako komplexní klinický syndrom vycházející ze strukturálního nebo funkčního poškození myokardu, které negativně ovlivňuje schopnost srdce dopravovat okysličenou krev do organismu v množství dostatečném k pokrytí metabolických požadavků jednotlivých tkání (Braunwald E., 2015).

Symptomaticky se srdeční selhání projevuje zejména výraznou limitací pacientů dušností, hypotenzí, tachykardií a perzistencí známek systémové nebo plicní kongesce. V průběhu progresu srdečního selhání často dochází k rozvoji renální insuficience, rozvoji plicní hypertenze a následně i k rozvoji multiorgánového selhání. Terminální stavy CHSS jsou velmi často doprovázeny svalovou atrofií a celkovou kachexií.

Srdeční selhání bylo v minulosti charakterizováno zejména snížením systolické funkce levé komory (LK) a tedy poklesem ejekční frakce LK. Později bylo popsáno i srdeční selhání se zachovalou ejekční frakcí LK. Hodnocení ejekční frakce LK však zůstává významným prognostickým ukazatelem, kdy prognóza pacientů se sníženou ejekční frakcí je horší (Lenzen M. J. et al., 2004). Mezi nejčastější příčiny systolické dysfunkce řadíme ischemickou chorobu srdeční, arteriální hypertenzi, idiopatickou dilatační kardiomyopatii, abususe alkoholu nebo podávání kardiotoxických léčiv. Etiologie CHSS se zachovalou ejekční frakcí je mnohem méně objasněná.

Srdeční selhání představuje komplexní poruchu zasahující myokard na úrovni funkční, strukturální, biochemické i genové exprese. Proces kardiální remodelace následně vyústí v terminální srdeční selhání. Po dlouhá léta byla ireverzibilita proběhlé srdeční remodelace akceptována jako fakt.

Zavedení mechanických srdečních podpor do klinické praxe přineslo mnoho revolučních poznatků. Mechanické srdeční podpory poskytují tlakové i objemové odlehčení myokardu, což otevírá prostor k nápravě proběhlých kompenzačních mechanismů – reverzní remodelaci myokardu (Drakos S. G. a Mehra M. R., 2016).

Vhodnou kombinací mechanické srdeční podpory a farmakoterapie bylo v pilotních studiích dosaženo zotavení myokardu v takovém rozsahu, že byla možná explantace mechanické srdeční podpory (Birks E. J. et al., 2011). Jedním z cílů moderní léčby srdečního selhání je maximalizace podílu pacientů, u kterých k zotavení dojde, což by vedlo ke snížení potřeby dárců orgánů.

Nalezení spolehlivého terapeutického postupu k úspěšnému zotavení poškozeného myokardu vyžaduje detailní prozkoumání procesu reverzní remodelace na mnoha úrovních. Jedním z úskalí této problematiky je volba správného načasování explantace mechanické srdeční podpory vzhledem k faktu, že paralelně s procesem reverzní remodelace může docházet vlivem odlehčení myokardu také k nežádoucí atrofii.

Právě rozvoj srdeční atrofie, jako následek dlouhodobého mechanického odlehčení, který byl popsán u pacientů s dlouhodobě implantovanou levostrannou mechanickou srdeční podporou (LVAD) (Maybaum S. et al., 2007), může limitovat zotavení myokardu a možnost explantace mechanické srdeční podpory (VAD).

Jedním z cílů naší práce je sledovat časový průběh atrofických změn na experimentálním modelu a následně hledat nové metody ovlivnění atrofie. Jako experimentální model jsme zvolili heterotopickou transplantaci srdce u inbredního kmene laboratorního potkana (*Lewis*), kde při vhodné konfiguraci lze sledovat změny následující po mechanickém odlehčení myokardu.

1.2. Pokročilá chirurgická léčba pacientů v terminálním stádiu srdečního selhání

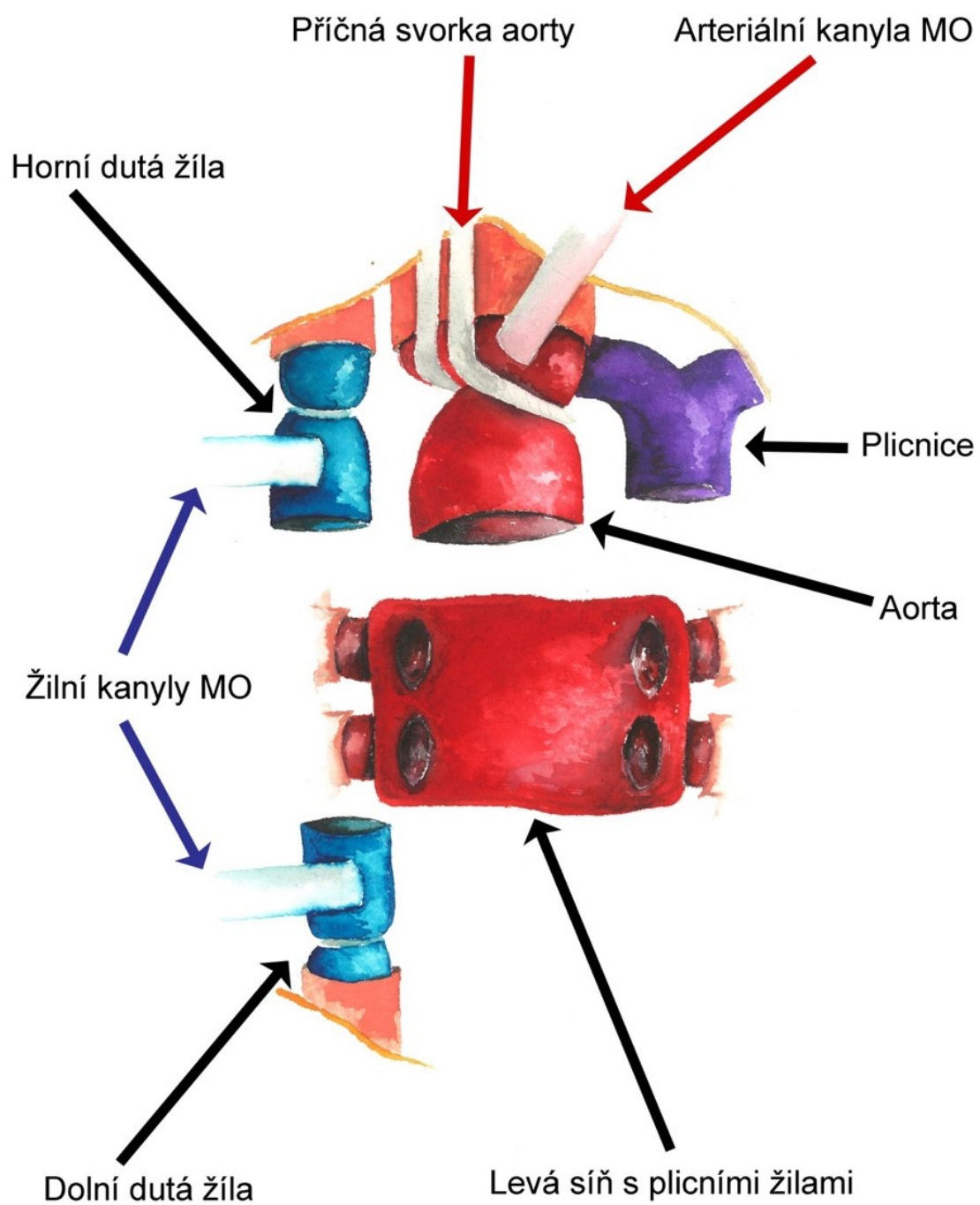
Vzhledem k rozvoji léčby akutních stavů v kardiologii postupně klesá mortalita na kardiovaskulární onemocnění, ale narůstá počet pacientů s CHSS, tedy takových, kteří přežijí akutní postižení srdce a nakonec dospějí do stádia CHSS i přes skutečnost, že moderní farmakologickou léčbou, ale i nefarmakologicky, lze rozvoj CHSS oddálit. I při

správně nastavené konzervativní léčbě bývá prognóza pacientů s CHSS nepříznivá a indikace transplantace srdce nebo implantace mechanické srdeční podpory je nevyhnutelná.

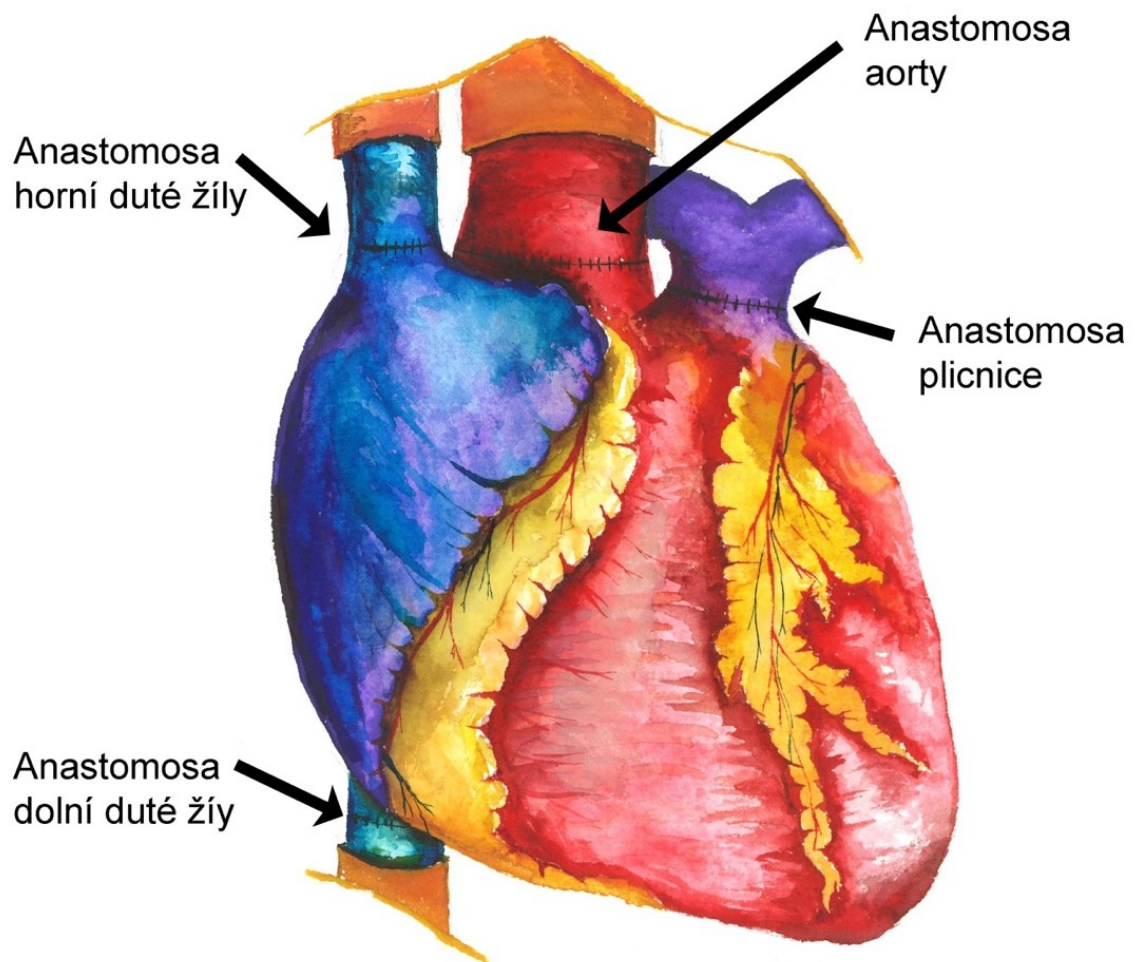
1.2.1. Ortotopická transplantace srdce

Ortotopická transplantace srdce představuje v současné době zlatý standard v léčbě terminální fáze srdečního selhání. Přestože první úspěšná transplantace srdce byla provedena týmem profesora Barnarda v Kapském městě již v roce 1967, k významnému rozvoji této terapeutické modality dochází až s rozvojem moderních imunosupresiv. Za přelomové lze označit zavedení imunosupresiva ze skupiny kalcineurinových inhibitorů (cyklosporin A) do běžné klinické praxe roku 1979 (Calne R. Y. et al., 1979).

V průběhu let došlo také k rozvoji chirurgické techniky ortotopické transplantace srdce. Primárně byla týmem prof. Shumwaye popsána technika biatriální, která spočívá v anastomóze recipročních oddílů srdce dárce do mediastina příjemce s ponecháním částí levé i pravé síně příjemce (Shumway K. E. et al., 1966). Postupně byla nahrazena modifikovanou technikou bikavální, kde dochází k odstranění celé pravé síně příjemce. Během bikavální transplantace srdce je prováděna anastomóza levé síně dárce na reziduum levé síně příjemce, následně anastomóza dolní duté žíly, horní duté žíly, aorty a plicnice. V současné době je tato technika z důvodu zachování morfologie pravé síně dárce preferována (Dreyfus G. et al., 1991) (Obr. 1. 1. a 1.2.).



Obr. 1. 1. Schéma pohledu do mediastina před ortotopickou transplantací srdce bikavální technikou po explantaci srdce.



Obr. 1. 2. Schéma pohledu do mediastina po ortotopické transplantaci srdce bikavální technikou.

1.2.2. Mechanické srdeční podpory

Mechanické srdeční podpory (VAD) jsou přístroje umožňující znovuoobnovení odpovídajících hemodynamických parametrů a orgánové perfuze u kriticky kardiálně selhávajících pacientů. VAD jsou využívány nejen u pacientů, kteří mají z časového hlediska nepříznivou prognózu dožití se transplantace, ale i u nemocných, kteří již z důvodu multiorgánové dysfunkce aktuálně překračují kritéria akceptovatelná pro provedení transplantace srdce (Hunt S. A. et al., 2005).

Užití mechanických srdečních podpor se stalo již rutinní součástí moderní kardiologie a kardiochirurgie. Nejdelší zkušenosti s mechanickými srdečními podporami máme v kontextu transplantace srdce, kde nám VAD umožňují přemostění kriticky nemocného pacienta do doby získání vhodného dárcovského orgánu. Technické inovace rozšiřují možnosti jejich využití i do nových indikačních skupin, prodlužují možnou dobu jejich užití a nové systémy také přinášejí možnost ambulantní léčby pacientů v terminálním stádiu CHSS. Vzhledem k současnému trendu stoupající prevalence terminálních forem srdečního selhání v populaci a neustálému nedostatku vhodných dárcovských orgánů, lze očekávat nárůst pacientů vyžadujících léčbu mechanickými srdečními podporami.

Koncept nahrazení srdeční činnosti byl poprvé prezentován Gibbonem v roce 1953 v podobě mimotělního oběhu. První implantace experimentální VAD na zvířecím modelu byla provedena již v roce 1958 (Akutsu T. a Kolff W. J., 1958). První úspěšná implantace VAD u člověka, jako most k transplantaci srdce, byla provedena v Houstonu, kdy byla srdeční podpora implantována pacientovi po kardiochirurgickém výkonu, kterého nebylo možné odpojit od mimotělního oběhu. Následně bylo pacientovi po 64 hodinách transplantováno srdce (DeBaakey M. E., 2000).

Mechanické srdeční podpory lze definovat jako čerpadla krve, která jsou u pacientů s pokročilým srdečním selháním schopna částečně nebo úplně převzít funkci srdce v krevním oběhu.

Podle cílového srdečního oddílu je možné VAD rozdělit na systémy:

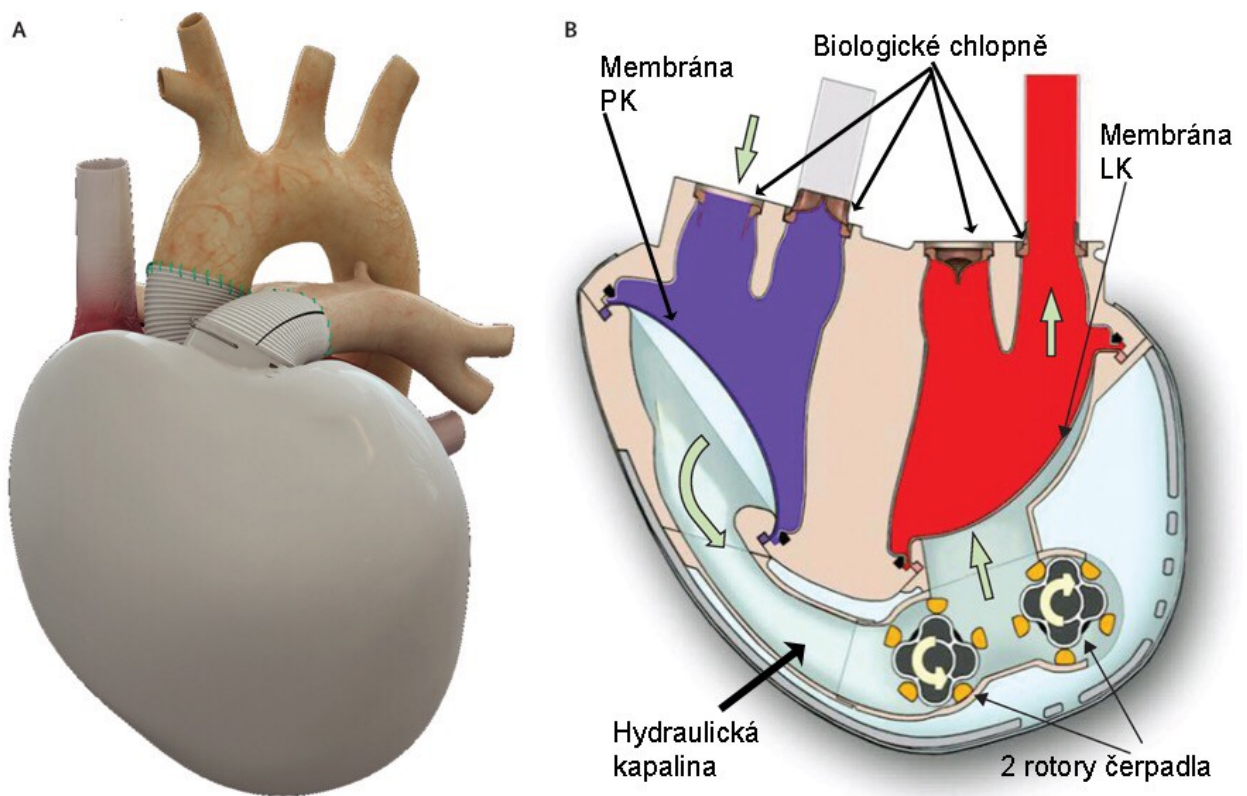
- a) Pro podporu levé komory (**LVAD** – “left ventricular assist device”)
- b) Pro podporu pravé komory (**RVAD** – “right ventricular assist device”)
- c) Pro podporu biventrikulární (**BIVAD** – “biventricular assist device”)

Za zmínku také stojí v současné době méně používané systémy, kdy ortotopicky umístěný systém kompletně nahrazuje činnost explantovaného srdce (**TAH** – “total artificial heart”) (Obr. 1. 3.).

U většiny pacientů dominuje selhání levé komory srdeční. Proto je nejčastěji indikováno použití levostranné VAD. O případném zavedení biventrikulární srdeční podpory rozhoduje zhodnocení reziduální funkce pravé komory a pokročilost multiorgánového selhání. Ve výjimečných případech se setkáváme s izolovanou dysfunkcí pravé komory. V takovém případě je indikováno použití krátkodobé pravostranné mechanické srdeční podpory. (Netuka I. et al., 2008).

S ohledem na charakter generovaného krevního toku lze mechanické srdeční podpory rozdělit na systémy pulzatilní a nepulzatilní. Pulzatilní mechanické srdeční podpory využívají principu pohybující se membrány poháněné na pneumatickém nebo elektromechanickém principu. Nepulzatilní systémy jsou v současné době užívány častěji a jejich průtok je generován axiální nebo centrifugální turbínou.

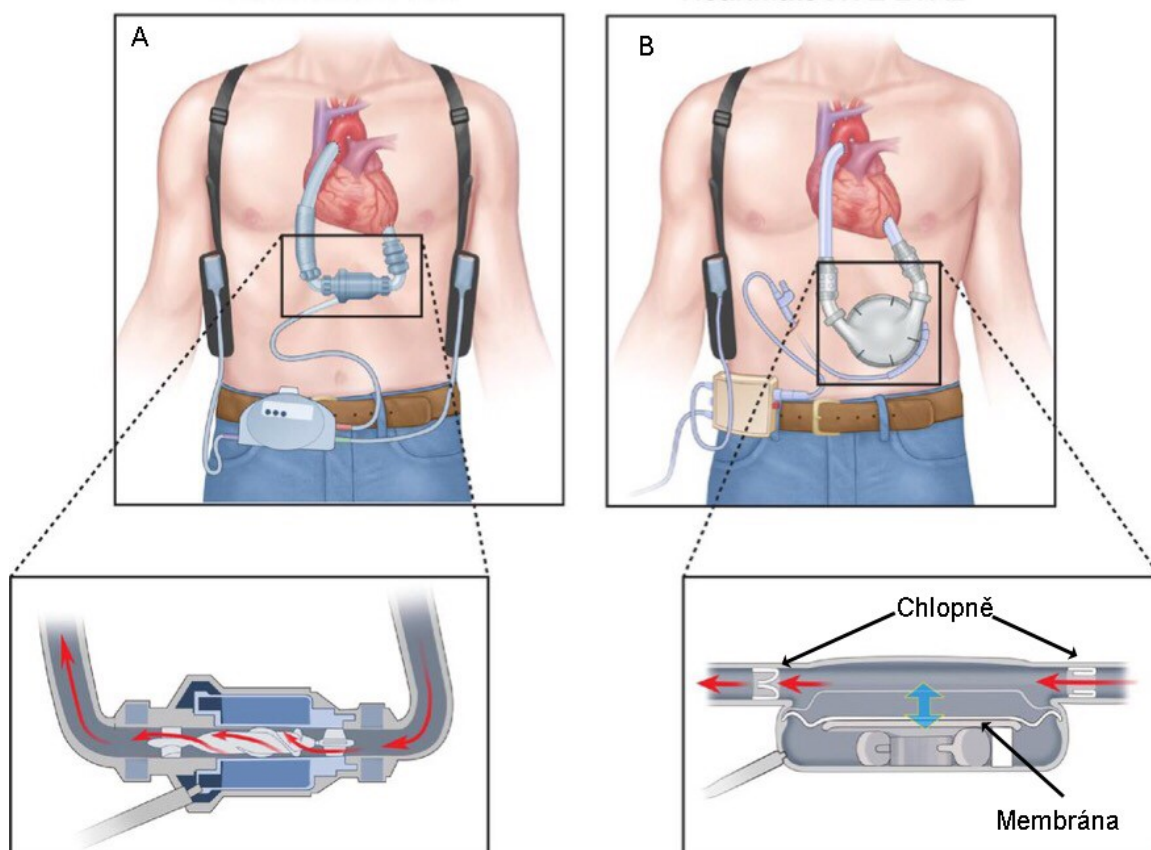
Nejnovější generace centrifugální mechanické srdeční podpory (Heart Mate III), která je již rutinně používána v klinické praxi, je schopná generovat arteficiální pulzovou vlnu s frekvencí 30/min (Netuka I. et al., 2018).



Obr. 1. 3. Kompletní biokompatibilní srdeční náhrada TAH CARMAT.

- A) Schéma po implantaci systému do mediastina po explantaci nativního srdce.
- B) Schématické znázornění funkce čerpadla a mechanismu generování pulzatilního průtoku krve prostřednictvím pohybu membrány a biologických chlopní.

Upraveno dle Carpentier A.et al., 2015



Obr. 1. 4. Schéma nepulzatilní a pulzatilní implantabilní mechanické srdeční podpory.

- A) Implantabilní LVAD s nepulzatilním průtokem generovaným pomocí axiální mikroturbíny.
- B) Implantabilní LVAD s pulzatilním průtokem generovaným pohybem membrány poháněné pneumaticky.

Upraveno dle Wilson S. R. et al., 2009

Z hlediska umístění hnací komponenty VAD rozlišujeme systémy parakorporální, kdy je VAD umístěna vně organismu a se srdečními oddíly je spojena transkutánně zavedenými kanylami, a systémy implantabilní, u kterých je VAD zavedena uvnitř těla

pacienta. Hlavní výhodou implantabilních VAD je zmenšení rizika infekce a výrazně vyšší komfort pro pacienta s možností ambulantní terapie (Netuka I. et al., 2008).

V souvislosti s technickým rozvojem VAD a miniaturizací jejich komponent, je možné se v současné klinické praxi setkat i se skupinou perkutánních VAD. Jedná se o krátkodobé mechanické srdeční podpory, které lze v akutních stavech zavádět katetrizačně a které existují jak pro konfiguraci levostranné, tak pravostranné srdeční podpory.

V klinické praxi přistupujeme k implantaci VAD u pacientů v terminální fázi srdečního selhání. Obecně platí, že pro takového pacienta je hodnota srdečního indexu CI menší než 2,0 l/min/m² a hodnota systémového systolického tlaku menší než 90 mmHg při adekvátní intravaskulární náplni a inotropní podpoře.

V současné době rozlišujeme následující základní indikace VAD.

1.2.2.1. Most k transplantaci srdce - Bridge to transplant

“Přemostění k transplantaci” představuje majoritní podíl v užití VAD. Pacienti v této skupině musí splňovat obecná kritéria pro transplantaci srdce. Po stabilizaci hemodynamiky a orgánových funkcí je pacient zařazen do čekací listiny transplantace srdce. Dle celkového stavu a typu použité VAD je zvažováno propuštění do domácího ošetřování. Úspěšnost přemostění k transplantaci srdce se pohybuje mezi 60-80%. Výsledky samotné transplantace jsou pak minimálně shodné s úspěšností transplantace bez předchozího použití VAD. Někteří autoři dokonce uvádějí vyšší úspěšnost u pacientů po použití VAD vzhledem k lepšímu stavu, ve kterém pacienti vstupují do operačního výkonu. (Fraizer O. H. et al., 1995, DeBy T. H. et al., 2017)

1.2.2.2. *Most k rozhodnutí - Bridge to decision, Bridge to bridge*

V této indikaci jsou implantovány zejména krátkodobé VAD u pacientů v kritickém cirkulačním stavu, nezřídka po kardiopulmonální resuscitaci, kde je obtížné zhodnotit reverzibilitu orgánových funkcí, neurologický statut pacienta, případně přítomnost fulminantní infekce. V indikaci “bridge to decision” tedy dojde k napojení pacienta na méně invazivní systém krátkodobé VAD, což během 2-4 týdnů umožní stabilizaci oběhu a zároveň zajistí prostor pro objasnění celkového stavu pacienta. V případě příznivého vývoje je pak dalším logickým krokem konverze na dlouhodobou VAD. Tato strategie může být označena jako “bridge to bridge”. (John R.et al., 2007)

1.2.2.3. *Most k zařazení na čekací listinu - Bridge to candidacy*

“Most k zařazení na čekací listinu” představuje terapeutickou indikaci VAD u pacientů, kteří splňují obecná kritéria pro zařazení k transplantaci srdce s výjimkou fixované plicní vaskulární rezistence přesahující akceptovatelné hodnoty. Bylo prokázáno, že po implantaci LVAD dochází ke snížení plicních tlaků v levostranných srdečních oddílech a následně i k postupným reverzním změnám v plicní cirkulaci, které postupně vedou k poklesu plicní rezistence k hodnotám, které již umožní zařazení pacienta na čekací listinu (Zimpfer D.et al., 2007).

1.2.2.4. *Cílová léčba – Destination therapy*

Cílová léčba představuje v posledních letech nejrychleji se rozrůstající skupinu, kdy je VAD implantována jako permanentní řešení u pacientů v terminálním stádiu srdečního selhání, u kterých věk či přidružené choroby vylučují jejich zařazení do transplantačního programu. Výsledky posledních klinických studií poukazují na významné zlepšení přežívání i kvality života pacientů s VAD ve srovnání s pacienty léčenými optimalizovanou konzervativní léčbou (Patel S.et al., 2016)

1.2.2.5. *Most k zotavení - Bridge to recovery*

“Most k zotavení” představuje potenciálně velmi slibnou terapeutickou indikaci, která by umožnila po implantaci VAD s odstupem času její následnou explantaci vzhledem k zotavení funkce myokardu. Bridge to recovery, jako terapeutická modalita, umožňuje zachování nativního srdce bez nutnosti transplantace a pozitivně tak přispívá k účinnější alokaci dárcovských orgánů. V současné době lze takový průběh sledovat zejména u pacientů po proběhlé akutní ischemii srdce, akutní myokarditidě nebo akutní rejekci srdečního štěpu. Vzhledem k velkému potenciálu reparace obvykle volíme středně až krátkodobé mechanické srdeční podpory.

Velmi nadějné výsledky byly publikovány při kombinované léčbě dilatační kardiomyopatie dlouhodobou VAD a farmakologickou antiremodelační terapií a následně clenbuterolem, která umožnila odpojení od přístroje VAD po 6-12 měsících až 63,12% léčených pacientů (Birks E. J. et al., 2011). V současné době probíhá řada studií zaměřených jednak na hledání optimálního léčebného protokolu, který by akcentoval proces reverzní remodelace v průběhu léčby VAD a také na identifikaci parametrů umožňujících explantaci VAD. To velmi těsně souvisí s potřebou nalezení správného načasování explantace mechanické srdeční podpory (Dandel M. et al., 2011).

Jedním z hlavních limitujících faktorů zotavení myokardu a následné možnosti explantace mechanické srdeční podpory je rozvoj jeho atrofie.

1.3. Atrofie myokardu

Srdeční atrofii lze definovat jako získanou redukci velikosti a hmoty srdce, která je charakteristická poklesem hmotnosti orgánu, zvýšenou pigmentací, současnou atrofií subepikardiálního tuku a zvýšenou tortuositou koronárních arterií (Hellerstein H. K. a Santiago-Stevenson D., 1950). Srdeční atrofie se může rozvinout na podkladě hemodynamického nebo metabolického odlehčení myokardu. Kardiální atrofická remodelace může probíhat jako poměrně rychlá odpověď na řadu různých stimulů jako například prolongovaná imobilita a pobyt na lůžku, hladovění, kachexie spojená s nádorovými onemocněními, chronická infekce, dlouhodobá terapie VAD, nebo dokonce pobyt v beztlakovém stavu (Hellerstein H. K. a Santiago-Stevenson D., 1950, Perhonen M. A. et al., 2001, Braunwald E., 2015).

Myokard vykazuje značnou míru plasticity, což je proces založený na rychlé kontrole proteosyntézy a proteolýzy, který umožňuje rychlou adaptaci na aktuální stimuly. V závislosti na typu stimulu následně převládají atrofické, nebo hypertrofické změny. Jinými slovy tedy lze atrofii definovat jako posun v rovnováze obratu bílkovin ve prospěch proteolýzy. Podle intenzity stimulu a jeho trvání dochází k rozvoji reverzibilních nebo ireverzibilních změn (Baskin K. B. a Taegtmeyer H., 2011, Bloomekatz J. et al., 2016).

1.3.1. Atrofie myokardu asociovaná s mechanickým odlehčením srdečních oddílů

Ve spojení s mechanickým odlehčením srdce v rámci užití VAD v terapii terminálního srdečního selhání dominují pozitivní změny, které můžeme označit termínem reverzní remodelace myokardu. Řada klinických studií konzistentně prokázala úpravu patologické hypertrofie myokardu, kalciové homeostázy, posílení beta adrenergní signální dráhy a elektrofyziologickou remodelaci (DeBakey M. E., 2000, Rodrigue-Way A. et al., 2005, Drakos S. G. et al., 2010, 2012, 2016).

Vyvstává zde však otázka, nakolik je úprava kontraktility myokardu spojená s redukcí velikosti zejména levé komory a velikosti kardiomyocytů. Bohužel musíme konstatovat, že některé změny následující mechanické odlehčení myokardu mají spíše nepříznivý charakter. Rozvoj atrofie původně hypertrofických srdečních oddílů představuje důležitou překážku při pokusech o zotavení myokardu (bridge to recovery) (Maybaum S.et al., 2007, Chaggar P. S.et al. 2016).

Rozvoj srdeční atrofie asociované s mechanickým odlehčením byl prezentován nejen klinickými studii (Maybaum S.et al., 2007), ale potvrzuje ho také řada experimentálních prací. Řadu cenných informací přineslo studium heterotopicky transplantovaného srdce u laboratorního potkana, kde data jasně prokazují rozvoj atrofické remodelace následkem mechanického odlehčení.

(Klein I., Samarel A. M.et al., 1991, Kolář F.et al., 1996, Rakušan K.et al., 1997, Oriyanhan W.et al., 2007, Brinks H.et al., 2014).

Rozvoj srdeční atrofie byl také prezentován ve studiích spojených s implantací VAD u zvířecího modelu (koza domácí) (Kinoshita M.et al., 1988, 1996).

Přesto otázka rozvoje srdeční atrofie následkem prolongovaného mechanického odlehčení zůstává kontroverzní. Existují klinické studie, které na podkladě měření velikosti kardiomyocytů a obsahu glykogenu popírají rozvoj atrofických změn u pacientů léčených VAD (Drakos S. G.et al., 2010). Můžeme tak konstatovat, že je prozatím málo známo o příčinách a průběhu atrofických změn následujících mechanické odlehčení myokardu a ještě méně je známo o signálních kaskádách a molekulárně biologickém pozadí procesů vedoucích k atrofické/hypertrofické remodelaci. Přestože byla uskutečněna řada výzkumů, stále nejsme schopni přesně definovat regulační mechanismy vedoucí k odlehčením indukované srdeční atrofii. Autofagie, apoptóza a řada cest proteinové degradace byly intenzivně studovány s vizí nalezení potenciální terapie

(Cao D. J.et al., 2013, Muranaka H.et al., 2010, Razeghi P.et al., 2003, Willis M. S.et al., 2009, Razeghi P.et al., 2007)

S cílem nalézt optimální recovery protokol zde vzniká potřeba dalšího klinického i experimentálního výzkumu.

1.3.2. Experimentální model – heterotopická transplantace srdce

Heterotopická transplantace srdce představuje optimální experimentální model mechanického odlehčení myokardu. Heterotopická transplantace srdce se v minulosti hojně užívala při vývoji nových imunosupresiv a kardioplegických roztoků. Poprvé byla chirurgická technika heterotopické transplantace srdce popsána v roce 1933 u psa (Mann D. L.et al., 1933), později v roce 1964 u laboratorního potkana (Abbott C. P.et al., 1964) a v roce 1973 také u myši (Corry R. J.et al., 1973).

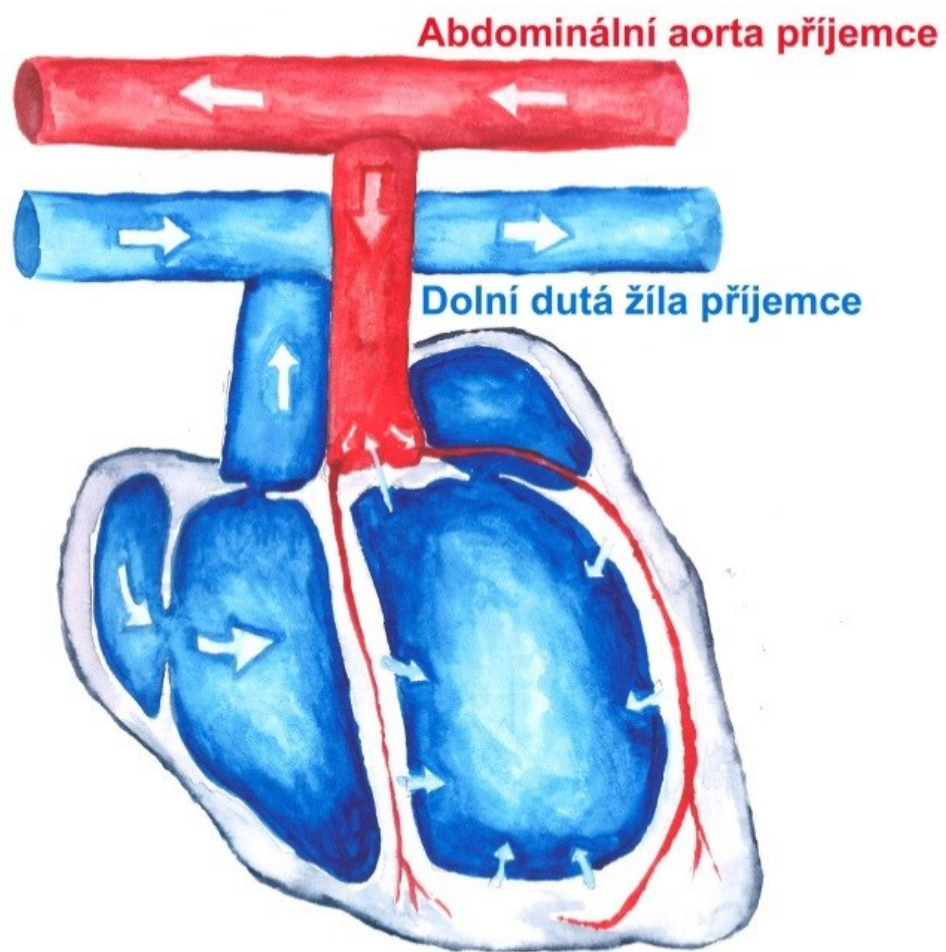
Heterotopická transplantace srdce spočívá v mikrochirurgické implantaci srdce do těla příjemce, kdy srdce příjemce zůstává in situ, nedotčené. V rámci experimentální heterotopické transplantace je srdce nejčastěji implantováno abdominálně, cervikálně nebo femorálně. Postupně se nejčastěji užívanou stala abdominální heterotopická transplantace u laboratorního potkana s řadou modifikací. Nejčastěji je prováděna heterotopická transplantace srdce, kdy je dárcovská ascendentní aorta našita na infrarenální úsek abdominální aorty příjemce a plicnice dárce je našita na dolní dutou žílu. (Ono K. a Lindsey E. S., 1969)

Během testování a vývoje imunosupresiv byly heterotopicky transplantovány jak štěpy od různých kmenů laboratorních potkanů (alografty), tak od jiných živočišných druhů jako např. myši nebo křečků (xenografty).

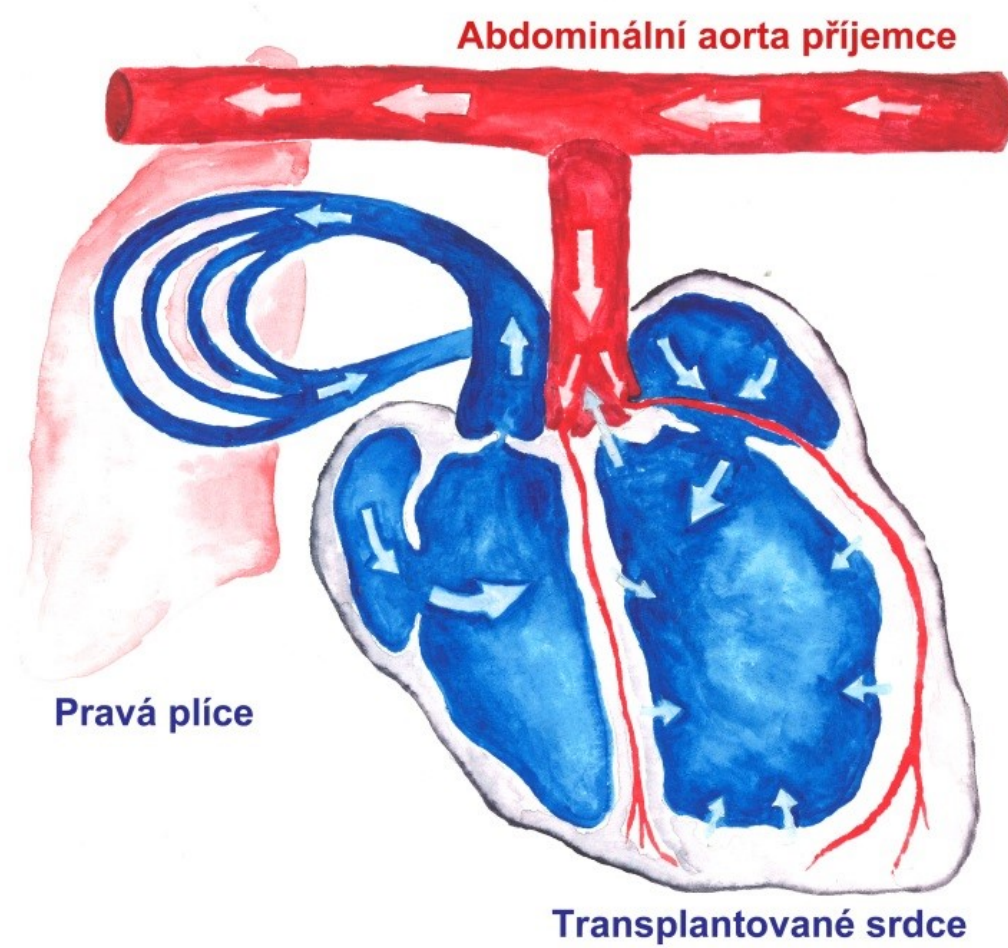
Později se heterotopická transplantace srdce u inbredních kmenů laboratorního potkana ukázala jako optimální experimentální model ke sledování změn následujících mechanické odlehčení myokardu (Fu X.et al., 2016). V současné době jsou k tomuto účelu

užívány dvě základní konfigurace abdominální heterotopické transplantace srdce. První z nich můžeme nazvat modelem úplného mechanického odlehčení myokardu, kdy je provedena anastomóza ascendentní aorty dárce na abdominální aortu příjemce a anastomóza plicnice dárce na dolní dutou žílu příjemce (Obr. 1. 5.). Druhá konfigurace, model parciálního mechanického odlehčení myokardu, spočívá pouze v provedení anastomózy ascendentní aorty dárce na abdominální aortu příjemce se zachováním alespoň dvou horních laloků pravé plíce (Obr. 1. 6.).

Pro lepší porozumění mechanismům, které probíhají po mechanickém odlehčení selhávajícího myokardu a tedy co nejbližšímu se přiblížení situaci v klinické praxi, lze provádět abdominální transplantaci srdce po navození srdečního selhání (Tsuneyoshi H. et al., 2005).



Obr. 1. 5. Schéma heterotopické transplantace srdce – model úplného mechanického odlehčení.



Obr. 1. 6. Schéma heterotopické transplantace srdce – model parciálního mechanického odlehčení.

1.4. Možnosti ovlivnění atrofie myokardu

1.4.1. Farmakologické metody ovlivnění atrofie myokardu

I přes skutečnost, že jsou dlouhodobé VAD hojně používány v klinické praxi, permanentního zotavení myokardu bylo dosaženo pouze u velmi malého množství pacientů. Po celém světě byla vytvořena řada klinických protokolů, jejichž cílem je dosažení zotavení myokardu u co největší frakce pacientů léčených mechanickými srdečními podporami. Většina klinických protokolů je založena na kombinaci léčby VAD s farmakoterapií. Cílem léčby je podpora procesu reverzní remodelace a minimalizace nežádoucích procesů jako např. atrofie myokardu a fibrózy (Chaggar P. S. et al., 2016, Birks E. J. et al., 2013).

V souvislosti s potenciálním ovlivněním myokardiální atrofie se mezi testovanými farmaky jeví jako velmi slibné užití beta2 agonisty clenbuterolu. U clenbuterolu, který byl zprvu užíván v terapii astmatu, byl později prokázán i jeho anabolický efekt nejen na kosterní svalstvo (Choo J. J. et al., 1992), ale také na myokard laboratorního potkana (Petrou W. et al., 1995).

V klinické praxi byl za účelem ovlivnění atrofických změn u pacientů po implantaci mechanické srdeční podpory clenbuterol užíván v rámci recovery protokolu vypracovaného týmem profesorky Birks (Birks E. J. et al., 2006, 2011, 2013). Klinický protokol si kladl za cíl maximalizovat podíl pacientů u kterých dojde po implantaci VAD k zotavení myokardu, a také dosáhnout co nejlepších dlouhodobých výsledků u pacientů po explantaci VAD. Celý protokol byl založený na pravidelné monitoraci a testování pacientů. První fáze farmakoterapie po implantaci VAD byla cílena na podávání farmak, která by měla podpořit proces reverzní remodelace, normalizaci patologické hypertrofie srdečních oddílů a normalizaci buněčných a metabolických funkcí. Dle tolerance byly pacientům podávány: ACE inhibitory (až do dávky 40 mg Lisinoprilu/den), beta blokátory (až do

dávky 25 mg Carvedilolu 3x/den), antagonisté angiotenzinu II (až do dávky 100 mg Losartanu/den), antagonisté aldosteronu (až do dávky Spironolactonu 25 mg/den) a Digoxin (125 µg/den). Po dosažení echokardiografických známek reverzní remodelace byl beta blokátor Carvedilol nahrazen beta-1 selektivním blokátorem Clenbuterolem (podáván až do dávky 700 µg 3x/den). Díky tomuto postupu bylo dosaženo zotavení myokardu až u 73 % pacientů u systému pulzatilní VAD Heart Mate I (Birks E. J.et al., 2006) a 60 % pacientů u systému nepulzatilní VAD Heart Mate II (Birks E. J.et al., 2011). Tyto optimistické výsledky se bohužel prozatím nepodařilo jinde reprodukovat a tak hledání vhodného terapeutického protokolu zůstává nadále předmětem intenzivního výzkumu.

Z klinického pohledu se jako velmi slibný zdá rozvoj fyziologické hypertrofie srdce, který byl popsán u Krajty tygrovité (*Python molurus*) postprandiálně. Možnost navození fyziologické hypertrofie srdce by v klinické praxi mohla představovat úspěšnou strategii vedoucí k zotavení myokardu u pacientů léčených dlouhodobě VAD. U Krajty tygrovité byl popsán fenomén, kdy po pozření potravy dojde k rozvoji hypertrofie srdce (více než 40% nárůst hmotnosti levé komory) během 48 hodin. Celý tento děj je doprovázen mohutnou aktivací metabolismu mastných kyselin a zejména nárůstem tkáňové koncentrace kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové. V minulosti také bylo prokázáno, že infúze směsi uvedených mastných kyselin vede k rozvoji hypertrofie myokardu nejen u Krajty tygrovité, ale také u normotenzní laboratorní myši (Riquelme C. A.et al., 2011).

1.4.2. Mechanické způsoby ovlivnění srdeční atrofie

Srdeční atrofie je komplexně regulovaný fenomén, v jehož regulaci se uplatňuje široká škála signálních kaskád. S ohledem na plasticitu myokardu k rozvoji atrofie dochází kdykoliv poklesne srdeční náplň po delší časový úsek (Mann D. L.et al., 2012). Nejsnazší cestou ke znovunastolení rovnováhy mezi anabolickými a katabolickými procesy v

myokardu by bez pochyby bylo opětovné zvýšení srdeční náplně. V klinické praxi je však opětovné zatížení myokardu jen velmi obtížně realizovatelné vzhledem k závislosti pacienta na srdečním výdeji, který je zajišťován pomocí VAD tak, aby nedocházelo k orgánové hypoperfuzi. Vzhledem k výše uvedenému je u pacientů po implantaci VAD levá, respektive pravá komora, vyprázdněná a tak mechanicky odlehčená, a to zejména v iniciálním období. S cílem opětovného navýšení náplně odlehčených srdečních oddílů po implantaci VAD byl testován terapeutický protokol, kdy byly pacientům po implantaci nejprve podávány beta blokátory, ACE inhibitory, Spironolakton, kličková diuretika a Digitalis. Při detekci zlepšení funkce levé komory byly postupně snižovány dávky ACE inhibitorů a diuretik, čímž se zvýšila náplň a afterload levé komory. Při aplikaci uvedeného postupu bylo možné explantovat 18 % VAD po dosažení zotavení funkce myokardu (Dandel M.et al., 2011).

Při studiu na experimentálních modelech bylo prokázáno, že velikost srdce a případný rozvoj atrofie, nebo hypertrofie, je velkou měrou ovlivněn objemovým zatížením srdečních oddílů. Pro hledání možností ovlivnění atrofie myokardu je velmi vhodný model heterotopické transplantace srdce u laboratorního potkana. Již v minulosti byl u tohoto modelu prezentován rozvoj atrofických změn s maximem po 14 dnech mechanického odlehčení myokardu (Klein I.et al., 1990). Vliv následného zvýšení náplně levé komory byl testován pomocí inzercí kanyly do aortálního ústí transplantátu. Následkem zvýšeného plnění levé komory (insuficience aortální chlopně) a současného zvýšení afterloadu (stenóza aortální chlopně po inzerci kanyly) došlo k signifikantnímu nárůstu hmoty levé komory (Korecký B. a Masika M., 1991). Pro sledování vlivu izovolumického zatížení levé komory byl do levé komory srdce před transplantací umístěn latexový balónek naplněný fyziologickým roztokem. 14 dní po heterotopické transplantaci byl pozorován nárůst hmotnosti levé komory a zvýšená syntéza proteinů ve srovnání s kontrolní skupinou

po heterotopické transplantaci (Klein I., Hong C. et al., 1991). Další důkaz o nezbytnosti srdeční náplně pro dobrou kontraktilitu myokardu přinesla modifikace chirurgické techniky v průběhu heterotopické transplantace srdce - sutura levé síně transplantátu na dolní dutou žílu dárce, která byla následně podvázána proximálně, aby veškerý tok dolní dutou žílou procházel přes transplantát. Již po 7 dnech od transplantace byl prokázán signifikantní rozdíl v hmotnosti levé komory ve srovnání s mechanicky odlehčenými transplantáty (Galinanes M. et al., 1995).

Ve snaze sledovat, v jakém rozsahu je možné ovlivnit atrofické změny opětovným zatížením, byl proveden experiment na myokardu kočky domácí. Při první operaci byl odpojen papilární sval v pravé komoře, který byl po 7 dnech opět připojen k volné stěně pravé komory. Bylo tak prokázáno, že po 1 týdnu opětovného mechanického zatížení dochází téměř k úplné normalizaci ultrastrukturálních atributů a po 2 týdnech dochází k normalizaci kontraktility (Thompson E. W. et al., 1984). Jako důkaz kardiální plasticity může posloužit experiment s heterotopickou transplantací srdce u laboratorního potkana. V tomto experimentu byla nejprve provedena heterotopická transplantace srdce a plic (anastomóza ascendentní aorty dárce na abdominální aortu příjemce) a po dobu 14 dní probíhal rozvoj atrofických změn následkem mechanického odlehčení. Následnou reoperací, kdy byla našita plicnice dárce na abdominální aortu příjemce, došlo ke zvýšení náplně levé i pravé komory. Následkem provedené reoperace byl návrat hmotnosti levé i pravé komory téměř k normálním hodnotám (Mizuno T. et al., 2005).

Z výše uvedeného, že rozvoj atrofie myokardu, po jeho dlouhodobém mechanickém odlehčení, představuje významnou limitaci v procesu zotavení myokardu. Z tohoto důvodu se budeme v naší experimentální práci věnovat nalezení nových přístupů k zabránění rozvoje srdeční atrofie po mechanickém odlehčení. Experimentální studie budou

prováděny na modelu mechanického odlehčení myokardu – heterotopické transplantaci srdce u inbredního kmene laboratorního potkana (*Lewis*).

2. Hypotézy a cíle práce

Tato práce se věnuje sledování vlivu mechanického odlehčení na myokard a případný rozvoj atrofických změn. Dále se tato práce zabývá hledáním způsobu ovlivnění atrofie vzniklé po mechanickém odlehčení srdce. Působení mechanického odlehčení je sledováno na experimentálním modelu heterotopické transplantace srdce u laboratorního potkana inbredního kmene *Lewis*.

2.1. Rozvoj atrofie po mechanickém odlehčení zdravého a selhávajícího myokardu

Předpokládáme rozvoj atrofie myokardu po mechanickém odlehčení. Vzhledem k častému rozvoji kompenzatorní hypertrofie v průběhu progresu srdečního selhávání, lze očekávat výraznější rozvoj atrofických změn ve skupině heterotopicky transplantovaných srdcí po navození srdečního selhání.

2.2. Metabolické ovlivnění rozvoje atrofie myokardu po jeho mechanickém odlehčení

Navýšení koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové může vést k rozvoji hypertrofie myokardu. V naší studii budeme sledovat, zda dietou navozené navýšení koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové dokáže ovlivnit rozvoj atrofie po heterotopické transplantaci zdravého a selhávajícího myokardu.

2.3. Mechanické ovlivnění rozvoje atrofie myokardu po jeho mechanickém odlehčení

Míra izovolumické zátěže myokardu zásadním způsobem ovlivňuje rozvoj atrofie myokardu. Budeme sledovat, zda navýšení izovolumické zátěže myokardu, prostřednictvím trojramenného expandéru implantovaného do dutiny levé komory, povede ke zmírnění rozvoje atrofických změn po heterotopické transplantaci srdce.

2.4. Cíle studií:

- A) Sledování rozdílů v reakci myokardu zdravého srdce a srdce po navození srdečního selhání na mechanické odlehčení - **Studie č. 1**
- B) Zjištění vlivu dietou navozených zvýšených tkáňových koncentrací kyseliny palmitové, kyseliny palmitoolejové a kyseliny myristové na průběh rozvoje srdeční atrofie - **Studie č. 2**
- C) Zjištění vlivu zvýšeného izovolumického zatížení (po implantaci trojramenného expandéru) na průběh rozvoje srdeční atrofie - **Studie č. 3**

3.Studie č. 1

Sledování rozvoje atrofie myokardu po heterotopické transplantaci srdce u laboratorního potkana kmene *Lewis*

3.1. Úvod

Heterotopická transplantace srdce u laboratorního potkana může posloužit jako ideální experimentální model pro studium mechanického odlehčení srdečního oddílů. V naší první studii byly sledovány změny po heterotopické transplantaci srdce. Pro veškeré experimenty byl použit inbrední kmen (*Lewis*), aby nebylo nutné po heterotopické transplantaci srdce podávat imunosupresiva.

Ve všech experimentech byla heterotopická transplantace srdce prováděna v konfiguraci částečného odlehčení myokardu (Obr. 1.6.). Tato konfigurace byla zvolena s cílem co nejlépe se přiblížit situaci v klinické praxi. Implantace srdečního štěpu při této konfiguraci spočívala v anastomóze ascendentní aorty dárce na infrarenální segment abdominální aorty příjemce. Pro umožnění cirkulace krve z pravostranných srdečních oddílů byly ponechány na transplantátu dva horní laloky pravé plíce.

Průběh atrofických změn byl nejprve pozorován u normálního myokardu, tedy po transplantaci zdravého srdce. Následně byly analyzovány změny následující po heterotopické transplantaci selhávajícího myokardu. Pro účely sledování atrofických změn po periodě mechanického odlehčení selhávajícího myokardu byl použit experimentální model srdečního selhání.

Srdeční selhání bylo navozeno na podkladě objemového přetížení po založení aorto-kavální píštěle (ACF) v infrarenálním segmentu abdominální aorty jehlovou technikou (Garcia R. a Diebold S., 1990). Jedná se o efektivní metodu ověřenou řadou výzkumných týmů (Oliver-Dussault C.et al., 2010, Beneš J.et al., 2011).

Pro heterotopickou transplantaci byla odebírána srdce od dárců deset týdnů od vytvoření aorto–kavální píštěle. Z předchozích experimentálních studií vyplývá, že po 10 týdnech od založení ACF dochází k rozvoji pokročilého srdečního selhání, které je v tuto dobu ještě kompenzované. Po delším působení objemového přetížení dochází brzy po 10. týdnu k rozvoji dekompenzovaného srdečního selhání, které vede k multiorgánovému selhání a je doprovázeno rozvojem hypertrofie myokardu (Melenovský V. et al., 2012).

3.2. Cíle studie

- **Popsat a porovnat průběh srdeční atrofie** po heterotopické transplantaci zdravého srdce a srdce po navození srdečního selhání.
- **Popsat změny v šířce kardiomyocytů a percentálním zastoupení fibrózní tkáně v myokardu** po navození srdečního selhání a po heterotopické transplantaci zdravého a selhávajícího srdce.

3.3. Metodika

3.3.1. *Laboratorní zvířata*

Pro veškeré experimenty byli použiti dospělí samci inbredního kmene laboratorního potkana *Lewis*, o iniciální hmotnosti 310-330g (Charles River Laboratories, Velaz, Praha). Laboratorní zvířata byla chována v režimu 12h den / 12h noc a krmena standardním krmivem (0,45 % NaCl, 19-21% bílkovin, SEMED, Praha).

3.3.2. *Heterotopická transplantace srdce*

Heterotopická transplantace srdce (HTx) byla prováděna vždy ve stejné konfiguraci, tedy transplantace srdce a dvou horních laloků pravé plíce se suturou ascendentní aorty štěpu na infrarenální segment abdominální aorty.

Po celkové anestézii příjemce thiopentalem sodným (50 mg/kg tělesné hmotnosti intraperitoneálně) byla provedena příprava operačního pole, otevření dutiny břišní a

preparace infrarenální porce abdominální aorty v nezbytně nutném rozsahu pro provedení anastomózy a naložení příčných svorek.

Po přípravě příjemce byl dárci v inhalační anestézii (5% isofluran k úvodu do anestézie a poté 2%) podán heparin (5000 I.U., i.v.) a po uplynutí 2 minut byl zahájen odběr bloku srdce a 2 horních laloků pravé plíce. Odběr orgánů byl totožný ve všech skupinách. Otevřením hrudní dutiny střední sternotomií a následným protětím perikardu byl zajištěn přístup k srdci. Neprodleně po preparaci aortálního oblouku byl zakanylován aortální kořen cestou truncus brachiocephalicus a naložena příčná svorka na aortální oblouk distálně od kanyly. Po nastřížení horní i dolní duté žíly a levostranných plicních žil byla zahájena perfuze srdce vysokodraslíkovým kardioplegickým roztokem (St. Thomas), srdce bylo lokálně chlazeno ledovou tříští. Poté byl dokončen odběr srdce se dvěma laloky pravé plíce ligaturou a přerušením pravé i levé horní duté žíly, dolní duté žíly, levé plíce v hilu a také podvazem a oddělením dvou dolních laloků pravé plíce.

Implantace bloku srdce a 2 laloků pravé plíce byla zahájena po podání heparinu (2500 I.U. intravenózně) naložením svorek na infrarenální segment abdominální aorty příjemce. Po provedení podélné arteriotomie a výplachu aorty heparinizovaným fyziologickým roztokem byla provedena end-to-side anastomóza ascendentní aorty štěpu na abdominální aortu dvojicí monofilamentózních stehů (9-0).

Bezprostředně po dokončení anastomózy bylo provedeno odvzdušnění štěpu, uvolnění příčných svorek abdominální aorty a finální uzávěr dutiny břišní v anatomických vrstvách. Vitalita štěpu byla pravidelně kontrolována palpací kontrakcí v dutině břišní.

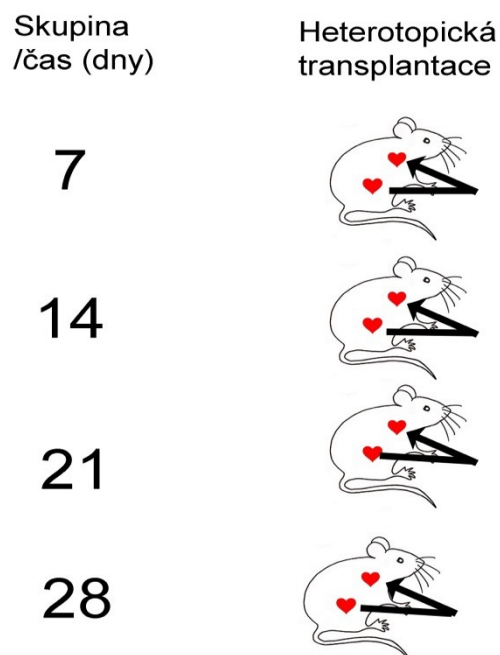
V termínech 7, 14, 21 a 28 dní od HTx byl, po terminální anestézii (midazolam 5 mg/kg + ketamin 50 mg/kg), proveden odběr heterotopicky transplantovaných srdcí, případně nativních srdcí, k histopatologické analýze. Ihned po terminální anestézii byla provedena preparace orgánů a jejich perfuze kardioplegickým roztokem (St. Thomas) a

následně perfuze a fixace za pomoci 4% roztoku paraformaldehydu. Fixované vzorky byly umístěny do Tissue-Tek bločků a podrobeny histopatologické analýze, byla měřena zejména šířka a délka kardiomyocytů. Po obarvení řezů vzorků pikrosírovou červení bylo měřeno zastoupení intersticiální fibrózy v levé a pravé komoře. Podíl myokardiální fibrózy byl vyjádřen procentuálně pomocí semikvantitativní analýzy (zvětšení 200x, program NIS-Elements Ar). Každou skupinu tvořilo 8 zvířat.

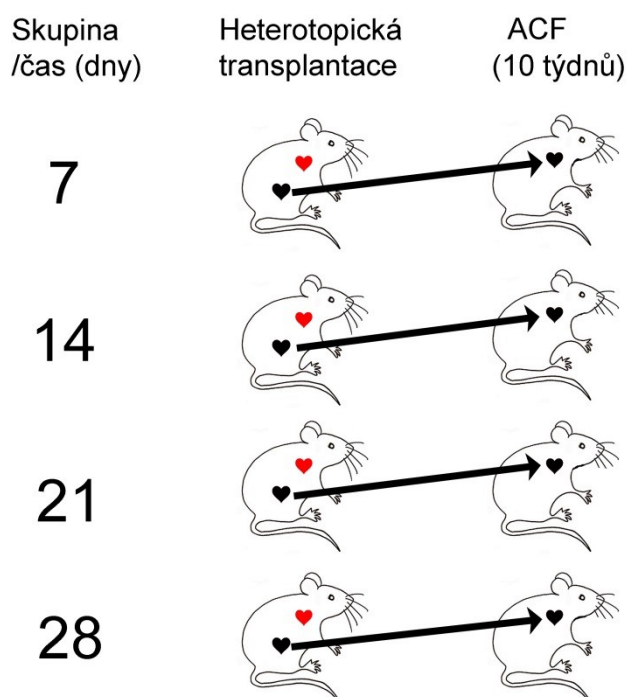
Pro účely vážení celého srdce a jednotlivých srdečních oddílů po explantaci byla ze srdce šetrně vytlačena zbylá krev a následně bylo srdce rozděleno na levou komoru + septum a pravou komoru. Poměry hmotností byly následně indexovány k délce tibie příslušného zvířete s cílem minimalizovat dopad rozdílného vzrůstu jednotlivých laboratorních potkanů (Yin F. C. P. et al., 1982).

Srdeční atrofie byla hodnocena jako úbytek hmotnosti celého srdce, levé komory včetně interventrikulárního septa a pravé komory. Úroveň atrofie byla vyjádřena poměrem hmotnosti heterotopicky transplantovaného srdce nebo jeho kompartmentů k příslušným hmotnostem kontrolní skupiny. Kontrolní skupinou pro heterotopicky transplantovaná zdravá srdce byla nativní ortotopická srdce (Obr. 3. 1.). Jako kontrolní skupina pro heterotopicky transplantovaná srdce po navození srdečního selhání sloužila nativní srdce od zvířat po navození srdečního selhání v příslušném týdnu (tedy 10+1, 10+2, 10+3, 10+4 týden) (Obr. 3. 2.).

Vzhledem k pokročilému srdečnímu selhání v 10. týdnu po vytvoření ACF a vysoké mortalitě není možné provádět HTx selhávajícího srdce takovýmito příjemcům.



Obr 3. 1. Schéma pomocí šipek znázorňuje příslušné kontroly pro heterotopicky transplantovaná zdravá srdce ve sledovaných časových úsecích.



Obr 3. 2. Schéma pomocí šipek znázorňuje příslušné kontroly pro heterotopicky transplantovaná srdce po navození srdečního selhání (ACF – aorto-kavální zkrat) ve sledovaných časových úsecích.

Jednotlivé skupiny tvořené vždy 8 zvířaty byly, jak je uvedeno v tabulce 3. 1.

Tabulka 3. 1. Přehled experimentálních skupin ve studii č. 1.

HTx = heterotopická transplantace srdce; ACF = aorto-kavální píštěl

Intervence	Čas od HTx	Skupina
		Nativní zdravé srdce 10 týdnů po sham operaci - kontrola
Heterotopická transplantace zdravé srdce	1 týden	HTx zdravého srdce
	2 týdny	HTx zdravého srdce
	3 týdny	HTx zdravého srdce
	4 týdny	HTx zdravého srdce
Heterotopická transplantace selhávající srdce	1 týden	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů)
	2 týdny	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů)
	3 týdny	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů)
	4 týdny	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů)
Nativní selhávající srdce - kontrola	X	Nativní selhávající srdce (ACF 10 týdnů)
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 11 týdnů)
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 12 týdnů)
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 13 týdnů)
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 14 týdnů)

3.3.3. *Statistická analýza výsledků*

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standardní chyba průměru), n představuje počet zvířat ve skupině. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty, které překročily 95% hranici pravděpodobnosti ($p < 0,05$). K vyhodnocení výsledků byl použit Studentův t-test a Wilcoxonův test, případně ANOVA. Ke statistické analýze dat byl použit program Graph-Pad Prism 7 (Graph Pad Software, San Diego, USA).

3.4. Výsledky

Tabulka 3.2. shrnuje základní charakteristiky skupin, které jsou použity v prezentaci výsledků jako kontrolní. Ve sledovaných parametrech (hmotnost nativního srdce (HW), hmotnost pravé komory (RVW), hmotnost levé komory včetně septa (LVW)) nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly. Hodnoty normalizované na délku tibie (TL), tedy HW/TL, LVW/TL a RVW/TL, představují kontrolní hodnoty (100%) v poměrech, který prezentujeme v následujících grafech a poměr tak vyjadřuje míru atrofie myokardu po HTx. Percentuální podíl normalizované hmotnosti heterotopicky transplantovaného srdce vztažený k normalizované hmotnosti ortotopicky uloženého nativního srdce sloužil jako základní indikátor rozvoje atrofie myokardu. Normalizovaný percentuální váhový úbytek bude prezentován v grafech (3. 1. – 3. 3.).

Tabulka 3. 2. Základní charakteristika kontrolní skupiny po heterotopické transplantaci zdravého srdce.

Skupina	Parametry						
	BW	HW	LVW	RVW	HW/TL	LVW/TL	RVW/TL
	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/mm)	(mg/mm)	(mg/mm)
Lewis 10 týdnů po sham operaci	320 ± 7	1055 ± 27	673 ± 14	219 ± 9	28.27 ± 0.81	18.03 ± 0.43	5.87 ± 0.23
Lewis po heterotopické implantaci srdce (1 týden)	346 ± 9	977 ± 16	671 ± 19	217 ± 8	28.24 ± 0.79	17.98 ± 0.42	5.81 ± 0.22
Lewis po heterotopické implantaci srdce (2 týdny)	341 ± 7	1014 ± 21	677 ± 18	204 ± 11	25.83 ± 0.86	17.34 ± 0.39	5.34 ± 0.27
Lewis po heterotopické implantaci srdce (3 týdny)	356 ± 8	1126 ± 24	695 ± 19	214 ± 9	28.11 ± 0.88	17.35 ± 0.45	5.34 ± 0.29
Lewis po heterotopické implantaci srdce (4 týdny)	360 ± 9*	1090 ± 29	701 ± 21	223 ± 11	27.98 ± 0.83	17.99 ± 0.41	5.72 ± 0.32

BW = tělesná hmotnost; HW = hmotnost ortotopického (*in situ*) srdce; LVW = hmotnost levé komory; RVW = hmotnost pravé komory; TL = délka tibie; *P<0.05 vs. Lewis 10 týdnů po sham operaci.

Tabulka 3. 3. prezentuje základní charakteristiky skupin po navození srdečního selhání vytvořením ACF. Z výsledků je patrné, že v průběhu 14 týdnů od vytvoření ACF dochází k rozvoji hypertrofie levé i pravé komory, což nasvědčuje progresi srdečního selhání. Zde uvedené hodnoty slouží jako kontrolní pro heterotopicky transplantovaná srdce po navození srdečního selhání.

Tabulka 3. 3. Základní charakteristika kontrolní skupiny po založení ACF.

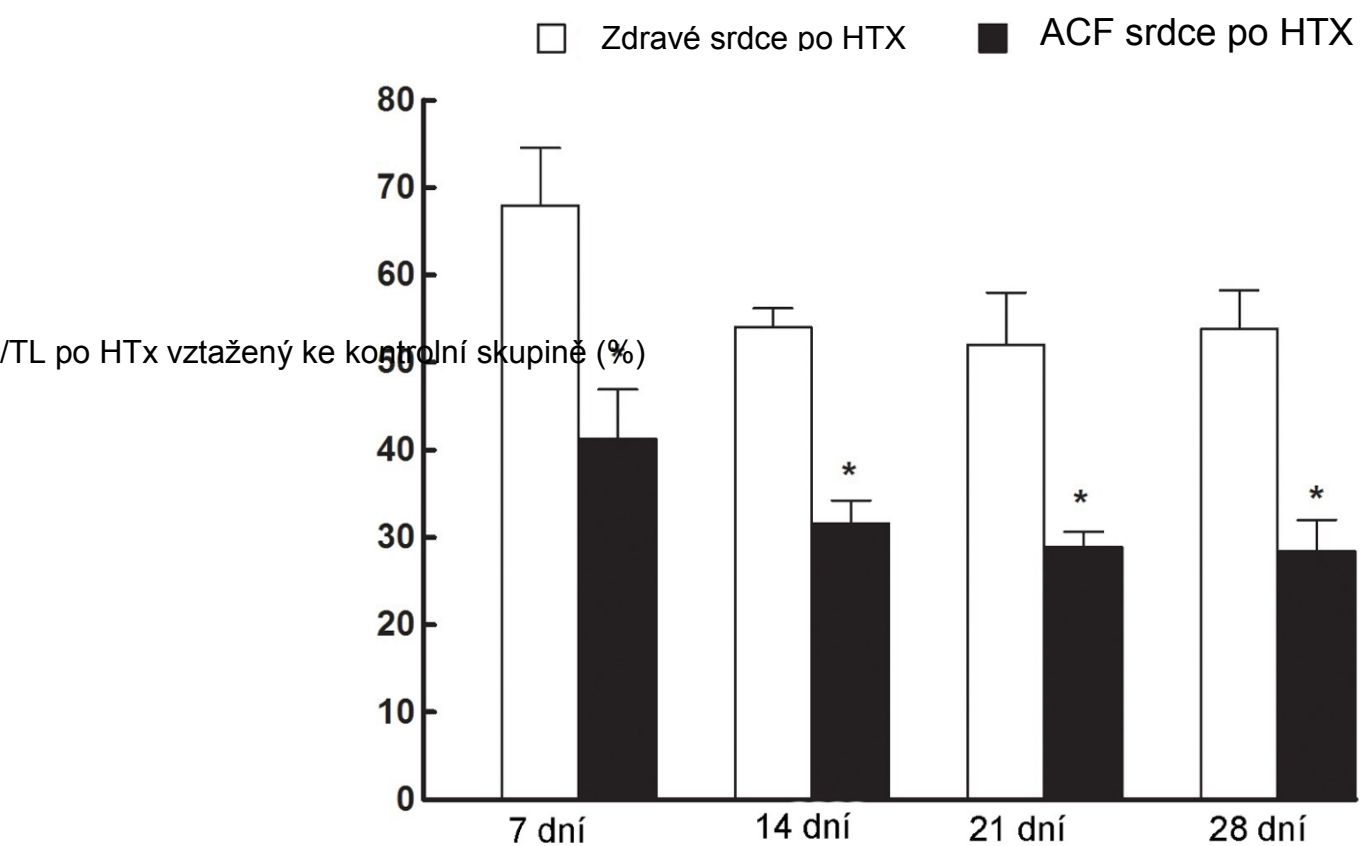
	Parametry						
	BW	HW	LVW	RVW	HW/TL	LVW/TL	RVW/TL
	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/mm)	(mg/mm)	(mg/mm)
Skupina							
<i>Lewis</i> 10 týdnů od vytvoření ACF	388 ± 9	2083 ± 64	1241 ± 48	467 ± 37	53.25 ± 1.19	31.72 ± 0.87	11.93 ± 0.58
<i>Lewis</i> 11 týdnů od vytvoření ACF	393 ± 9	2296 ± 71	1327 ± 56	528 ± 38	57.09 ± 1.14*	32.99 ± 0.79*	13.12 ± 0.96*
<i>Lewis</i> 12 týdnů od vytvoření ACF	403 ± 8*	2535 ± 76*	1420 ± 54*	540 ± 41*	62.87 ± 1.11*#	35.11 ± 0.89*#	13.34 ± 0.89*#
<i>Lewis</i> 13 týdnů od vytvoření ACF	434 ± 12*	2677 ± 55* [@]	1512 ± 49* [@]	675 ± 39* [@]	65.74 ± 0.96* [@]	37.14 ± 0.61* [@]	16.63 ± 0.58* [@]
<i>Lewis</i> 14 týdnů od vytvoření ACF	404 ± 9	2688 ± 54* [@]	1542 ± 51*	686 ± 41* [@]	66.81 ± 0.88*	38.43 ± 0.52*	17.15 ± 0.61*

ACF = aorto-kavální píštěl; BW = tělesná hmotnost; HW = hmotnost srdce; LVW = hmotnost levé komory; RVW = hmotnost pravé komory; TL = délka tibie.

*P<0.05 vs. *Lewis* 10 týdnů od vytvoření ACF; # P<0.05 vs. *Lewis* 11 týdnů od vytvoření ACF; @ P<0.05 vs. *Lewis* 12 týdnů od vytvoření ACF.

Již 7 dní po HTx zdravého srdce dochází následkem mechanického odlehčení myokardu k významnému poklesu hmotnosti srdce (pokles o $32 \pm 6 \%$). K nejvýznamnějšímu poklesu hmotnosti srdce dochází do 14 dne od HTx (pokles o $46 \pm 3 \%$). V pozdějších termínech (21 a 28 dní) od HTx srdce již není váhový úbytek tak významný. Váhový úbytek po heterotopické transplantaci selhávajícího myokardu probíhá analogicky, ale váhový pokles je ještě výraznější než u skupiny heterotopicky transplantovaných zdravých srdcí. Zaznamenaný pokles činil ve srovnání se skupinou zdravých (*in situ*) srdcí $59 \pm 5 \%$ vs. $32 \pm 6 \%$ po 7 dnech, $68 \pm 3 \%$ vs. $46 \pm 3 \%$ po 14 dnech, $70 \pm 2 \%$ vs. $45 \pm 5 \%$ po 21 dnech a $71 \pm 3 \%$ vs. $46 \pm 3 \%$ (Graf 3. 1.). Výše popisované změny jsou dobře patrné i makroskopicky (Obr. 3. 3.)

Dynamika váhového úbytku levé komory byla analogická změnám hmotnosti celého srdce, k významnějšímu váhovému úbytku docházelo u skupiny heterotopicky transplantovaných srdcí po navození srdečního selhání (Graf 3. 2.). Stejný trend změn byl pozorován také v případě váhového poklesu pravé komory (Graf 3. 3.).



HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

HW = hmotnost celého srdce

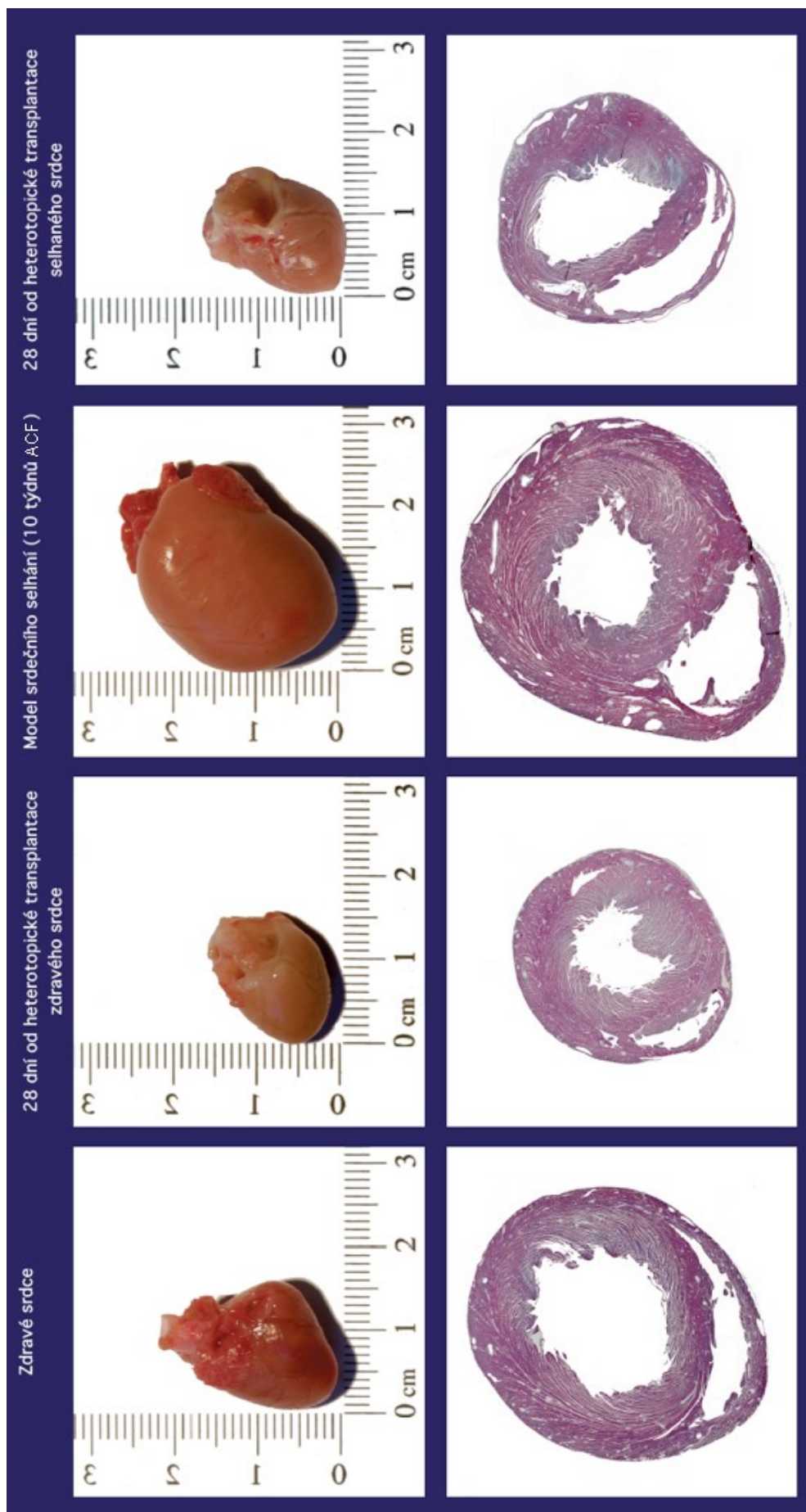
TL = délka tibie

* $P < 0.05$ vs. HTx zdravé srdce

Graf 3. 1. Změny hmotnosti celého srdce po HTx zdravého nebo selhávajícího srdce

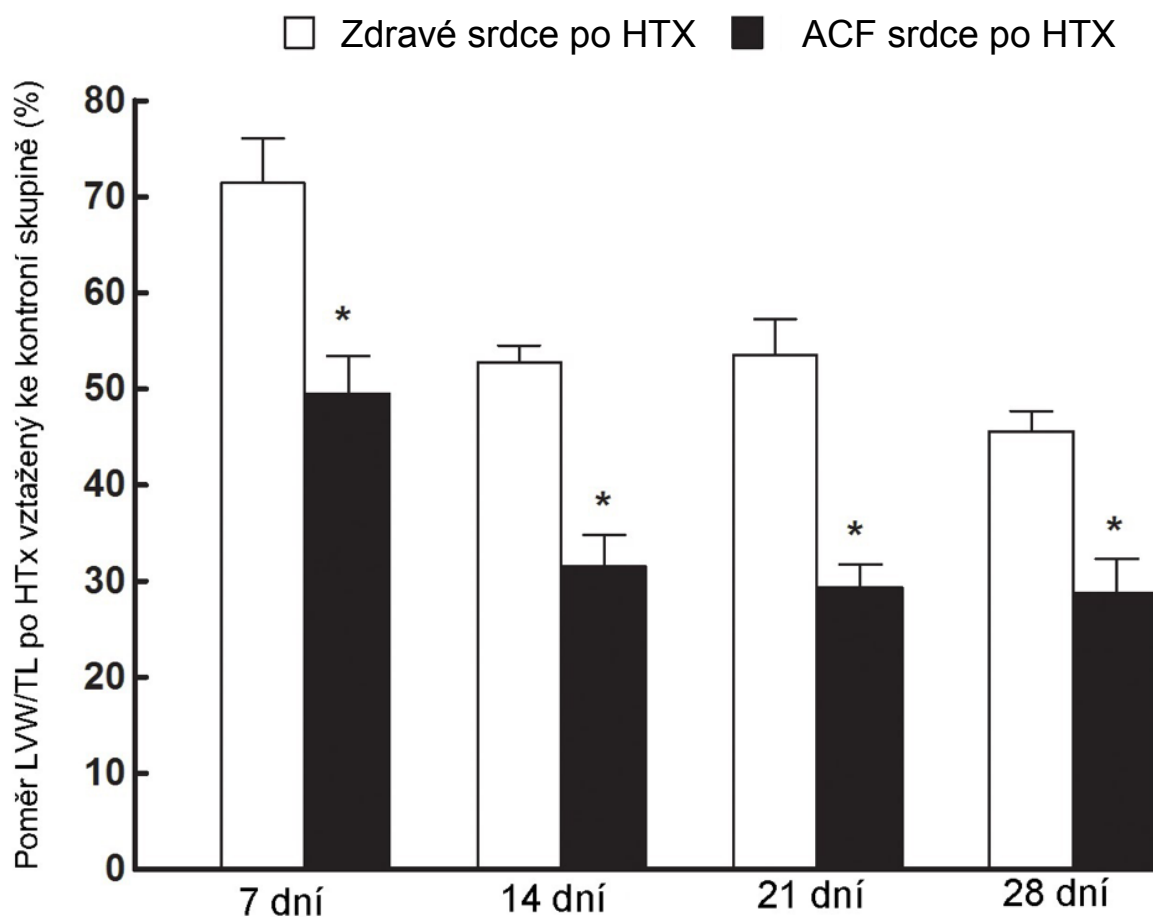
vyjádřené jako poměr hmotnosti celého srdce po HTx k hmotnosti kontrolní skupiny

(normalizováno na délku tibie).



Obr. 3. 3. – Makroskopický vzhled kontrolních skupin a heterotopicky transplantovaných srdcí 28. den.

1. sloupec zdravé srdce (sham), 2. sloupec zdravé srdce 28 dní po heterotopické transplantaci
3. sloupec srdce po navození srdečního selhání (ACF), 4. sloupec srdce po ACF a 28 dní po heterotopické transplantaci



HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

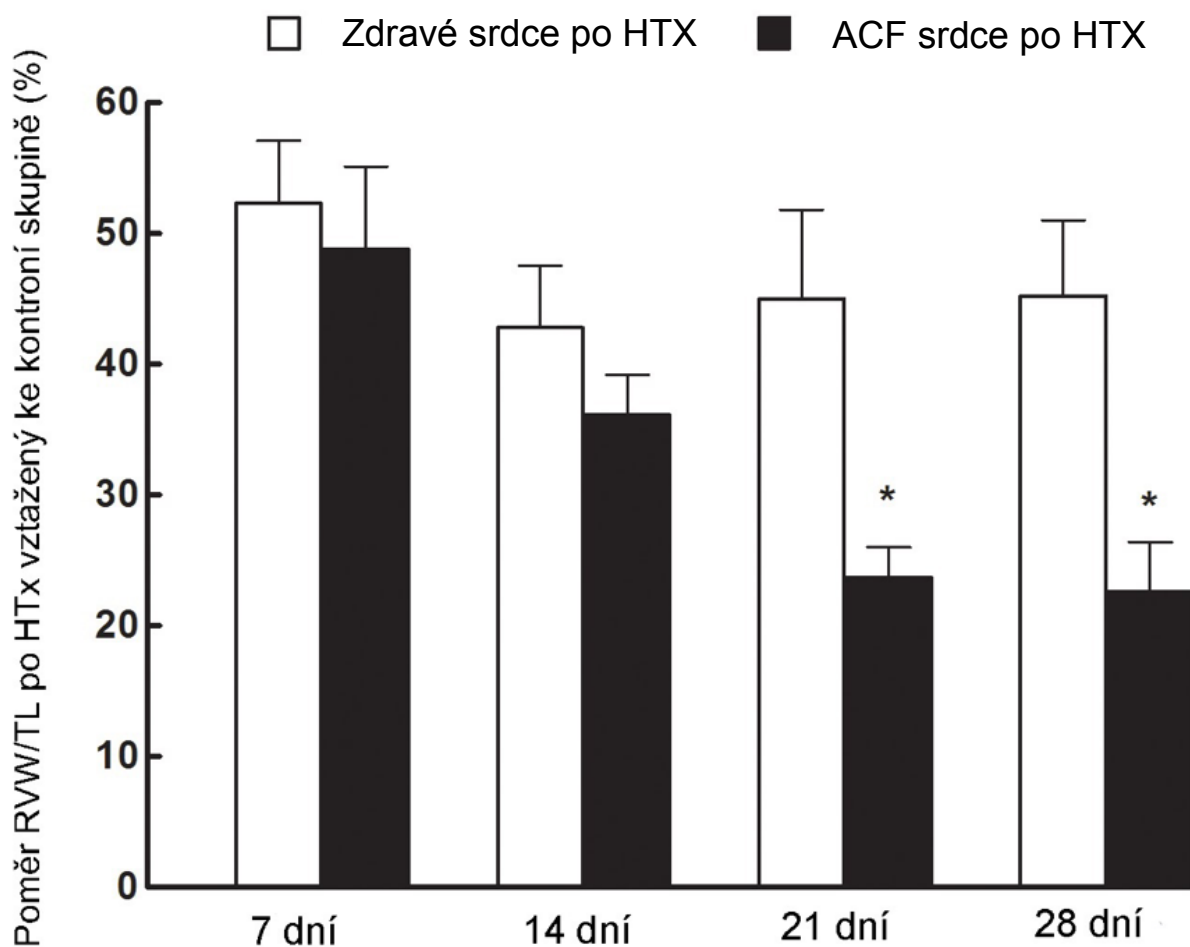
LVV = hmotnost levé komory

TL = délka tibie

* $P < 0.05$ vs. HTx zdravé srdce

Graf 3. 2. Změny hmotnosti levé komory po HTx zdravého nebo selhávajícího srdce

vyjádřené jako poměr hmotnosti levé komory po HTx k hmotnosti kontrolní skupiny (normalizováno na délku tibie).



HTx = heterotopická transplantace srdce

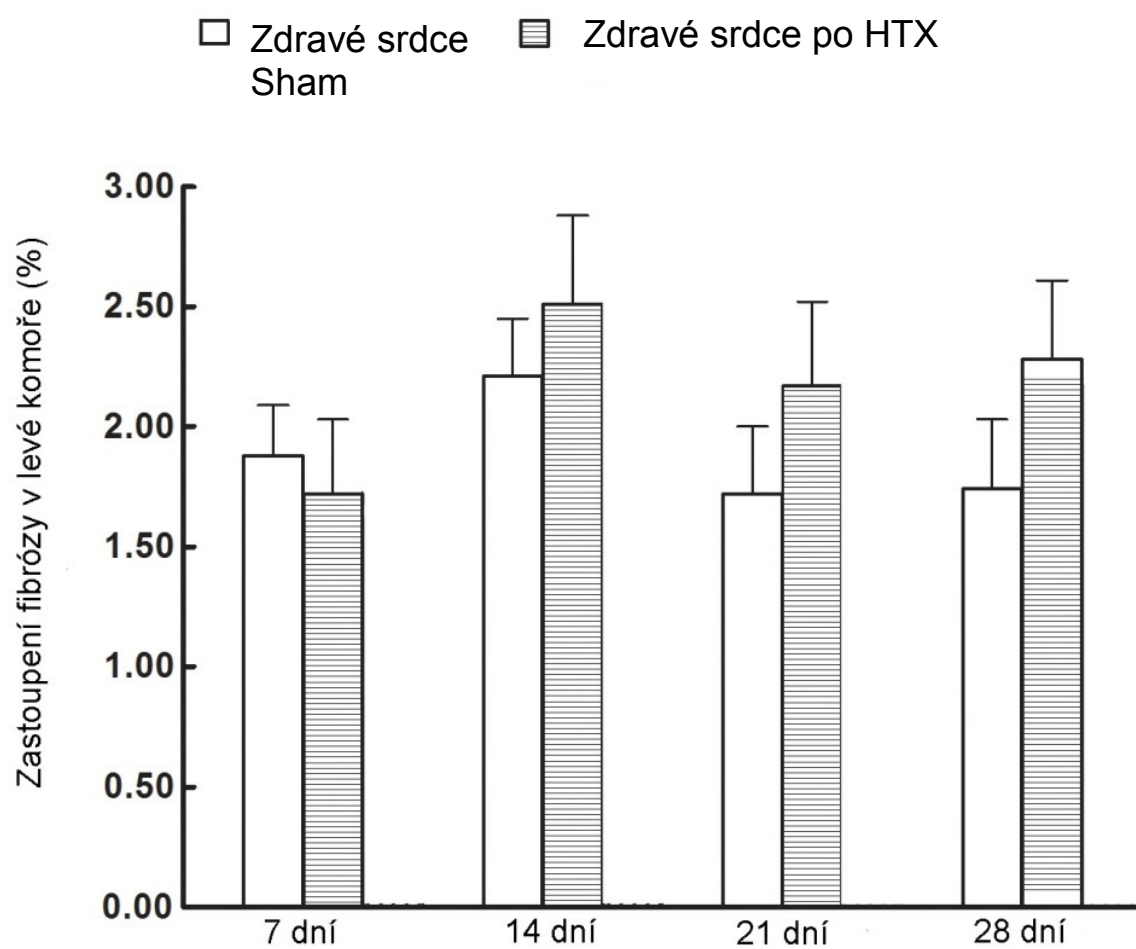
ACF = aorto-kavální píštěl

RVV = hmotnost pravé komory

TL = délka tibie

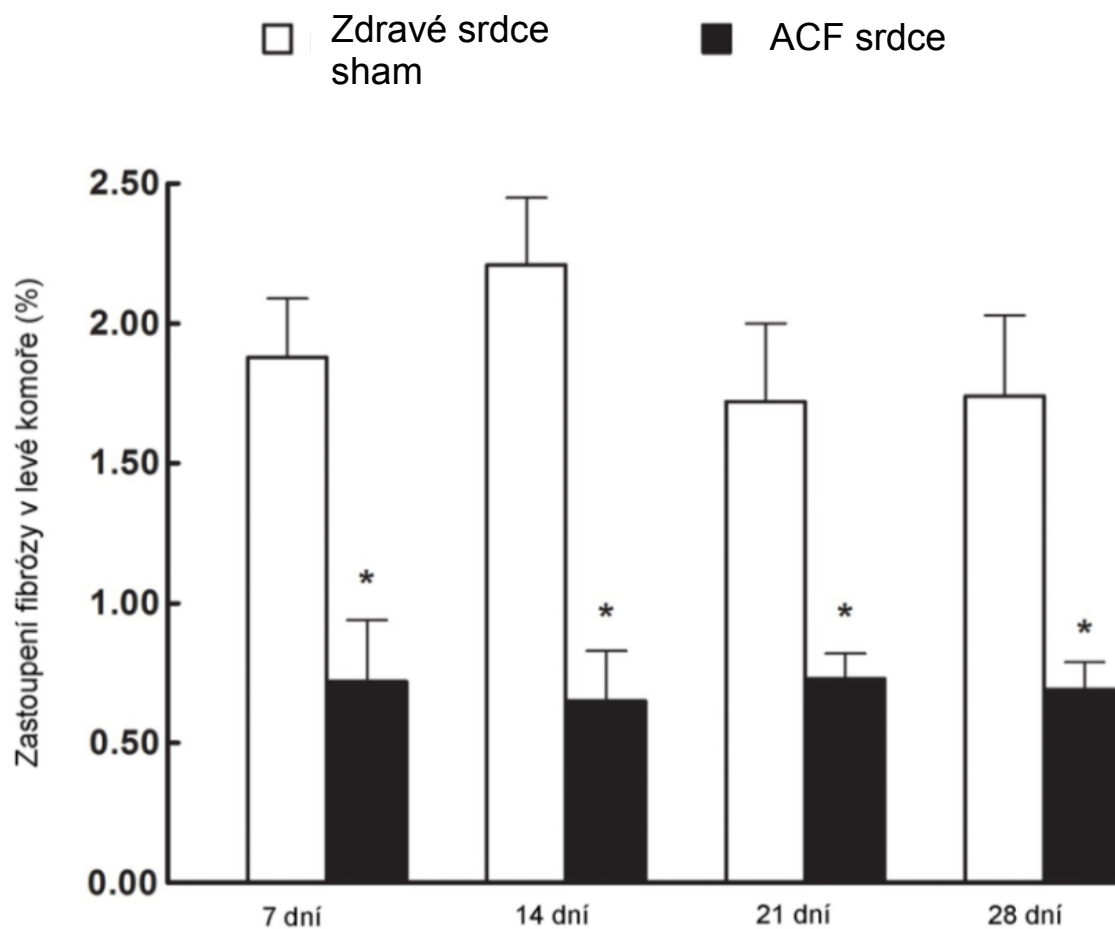
*P<0.05 vs. HTx zdravé srdce

Graf 3. 3. Změny hmotnosti pravé komory po HTx zdravého nebo selhávajícího srdce
vyjádřené jako poměr hmotnosti pravé komory po heterotopické transplantaci k hmotnosti kontrolní skupiny (normalizováno na délku tibie).



HTx = heterotopická transplantace srdce

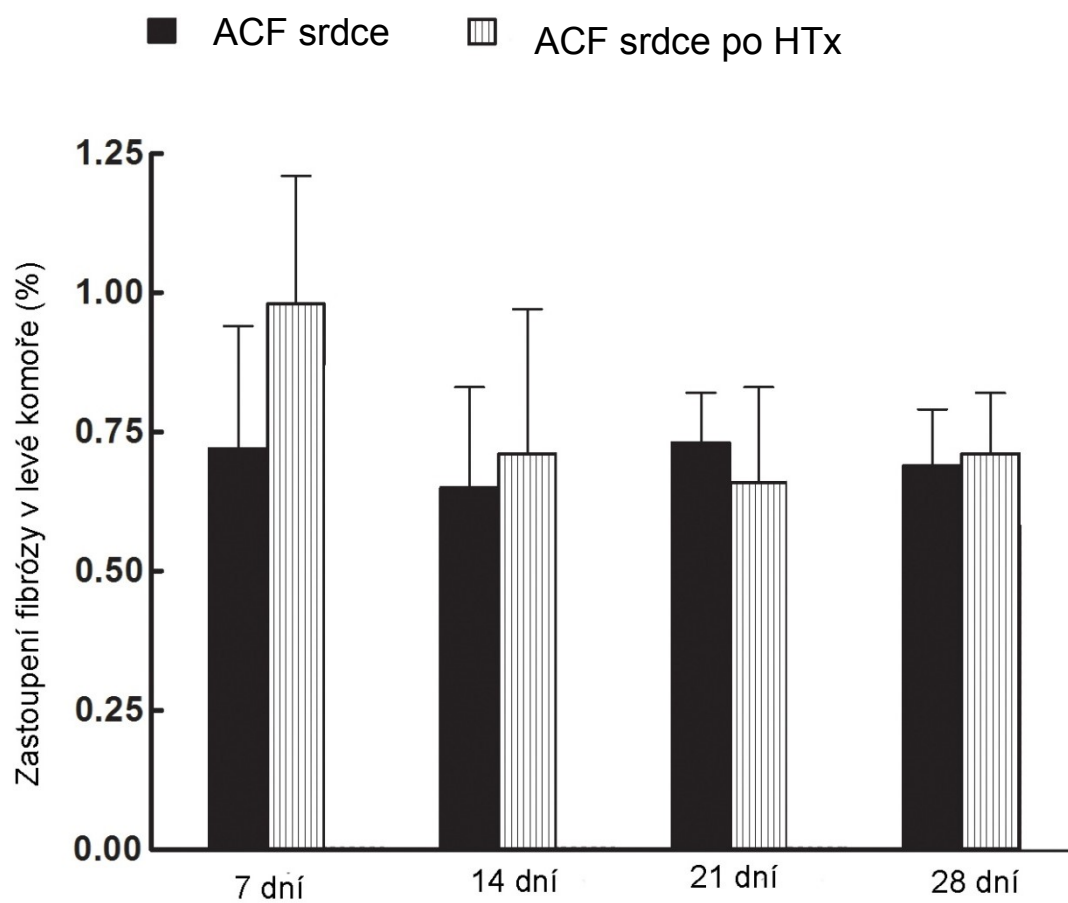
Graf 3. 4. Zastoupení myokardiální fibrózy levé komory po HTx zdravého srdce.



ACF = aorto-kavální píštěl

* $P < 0.05$ vs. nativní srdce (sham)

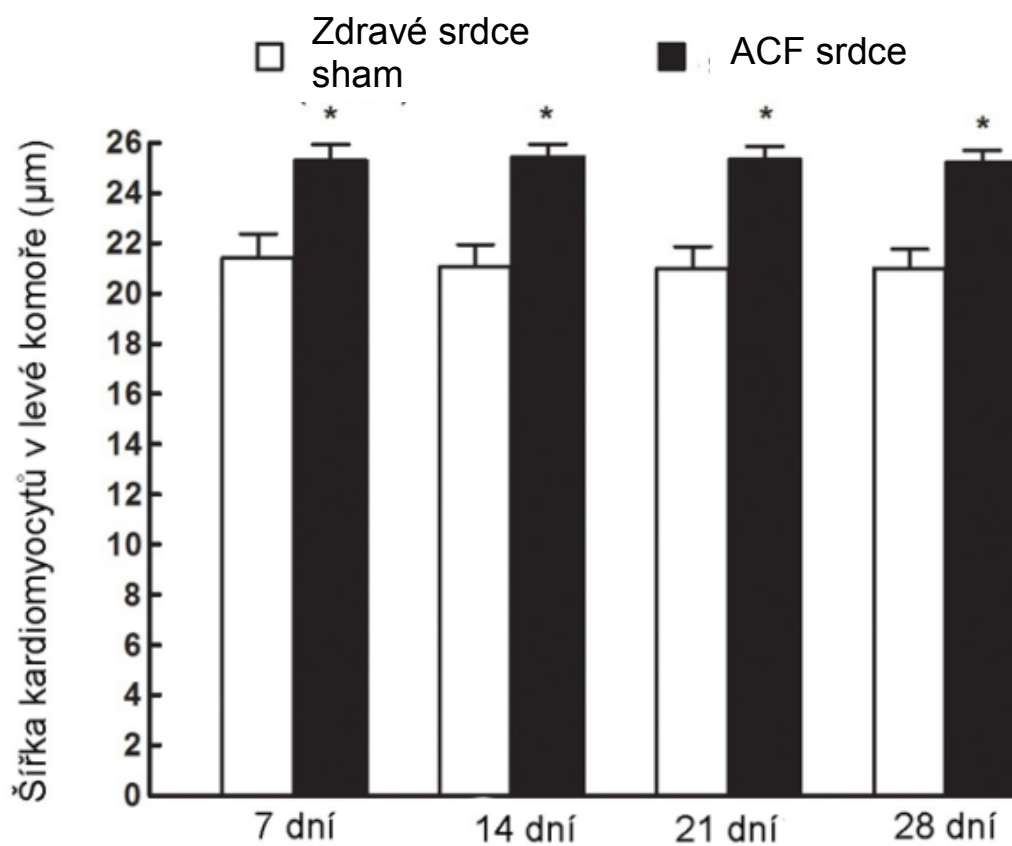
Graf 3. 5. Zastoupení fibrózy v levé komoře nativního zdravého a selhávajícího srdce.



HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

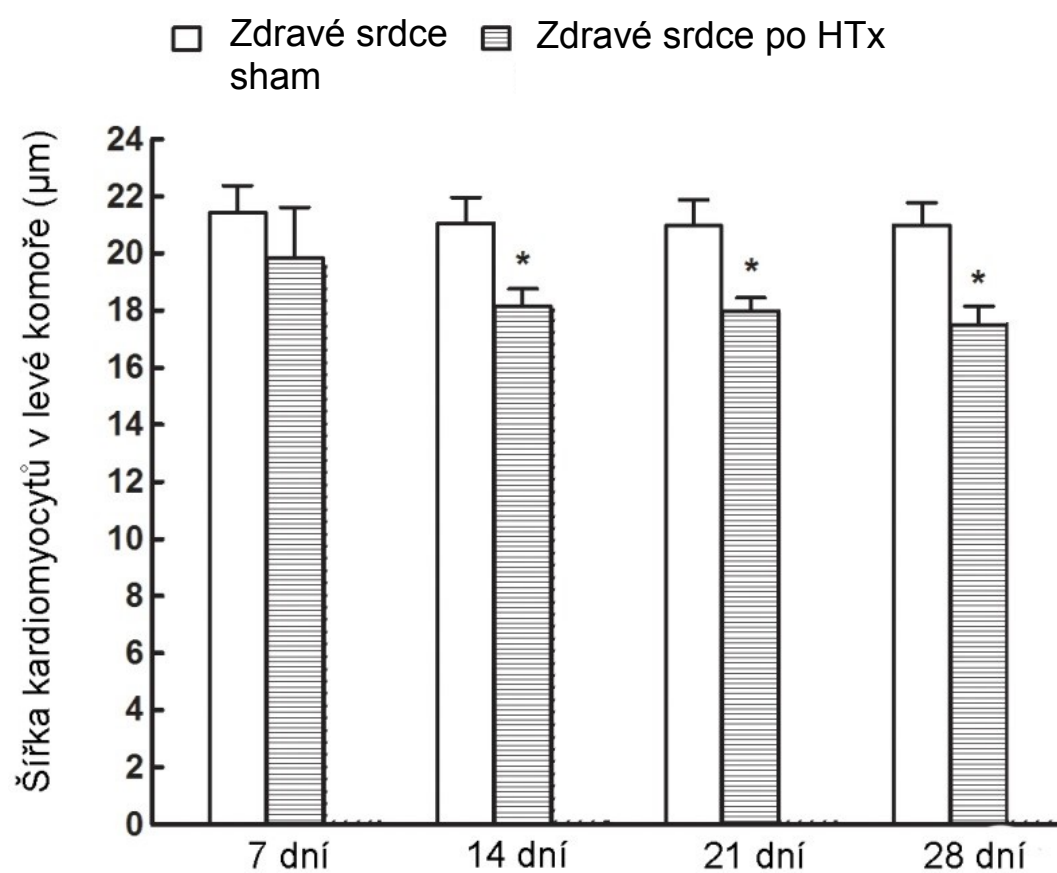
Graf 3. 6. Zastoupení myokardiální fibrózy levé komory po HTx selhávajícího srdce



ACF = aorto-kavální píštěl

* $P < 0.05$ vs. nativní srdce (sham)

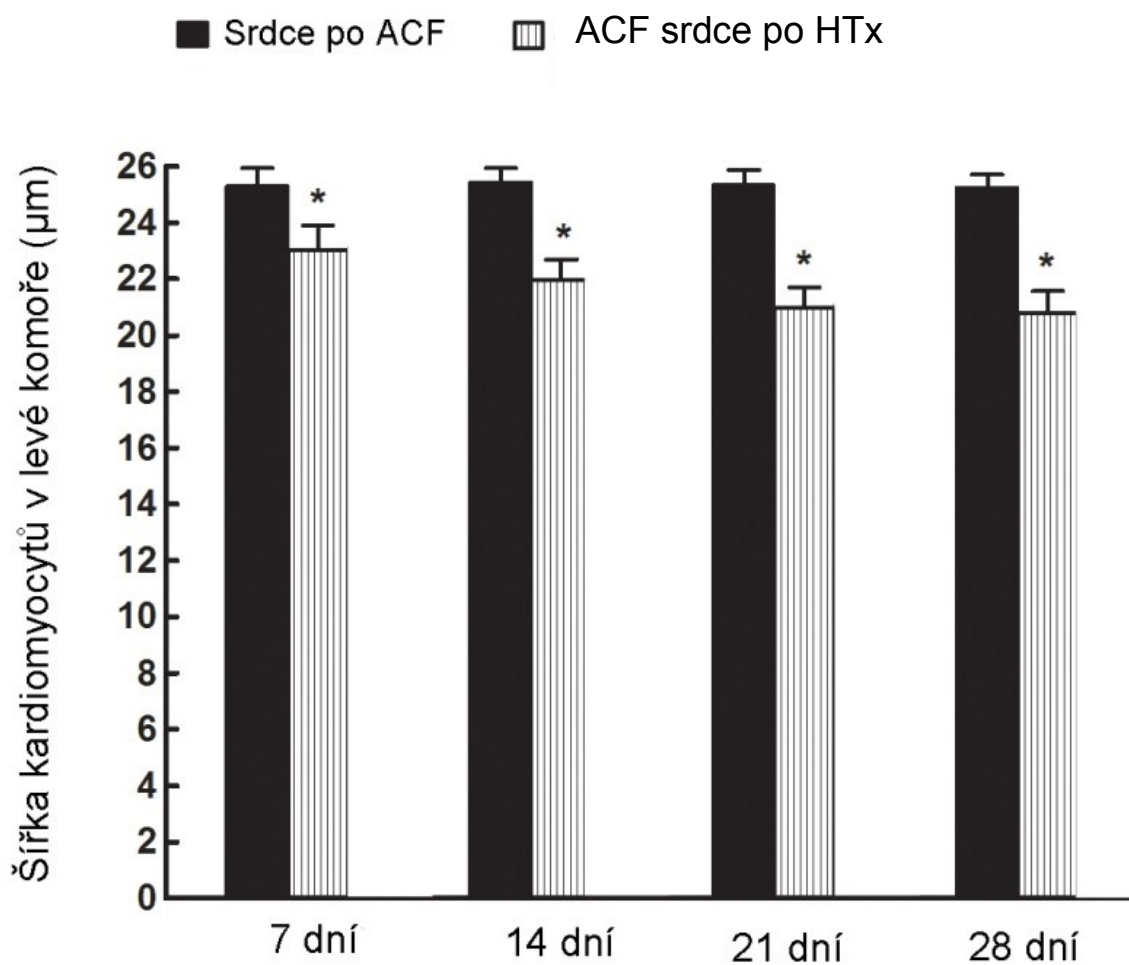
Graf 3. 7. Absolutní šířka kardiomyocytů v nativním zdravém myokardu a myokardu po navození srdečního selhání.



HTx = heterotopická transplantace srdce

* $P < 0.05$ vs. nativní zdravé (sham) srdce

Graf 3. 8. Změny šířky kardiomyocytů v levé komoře po HTx zdravého srdce.

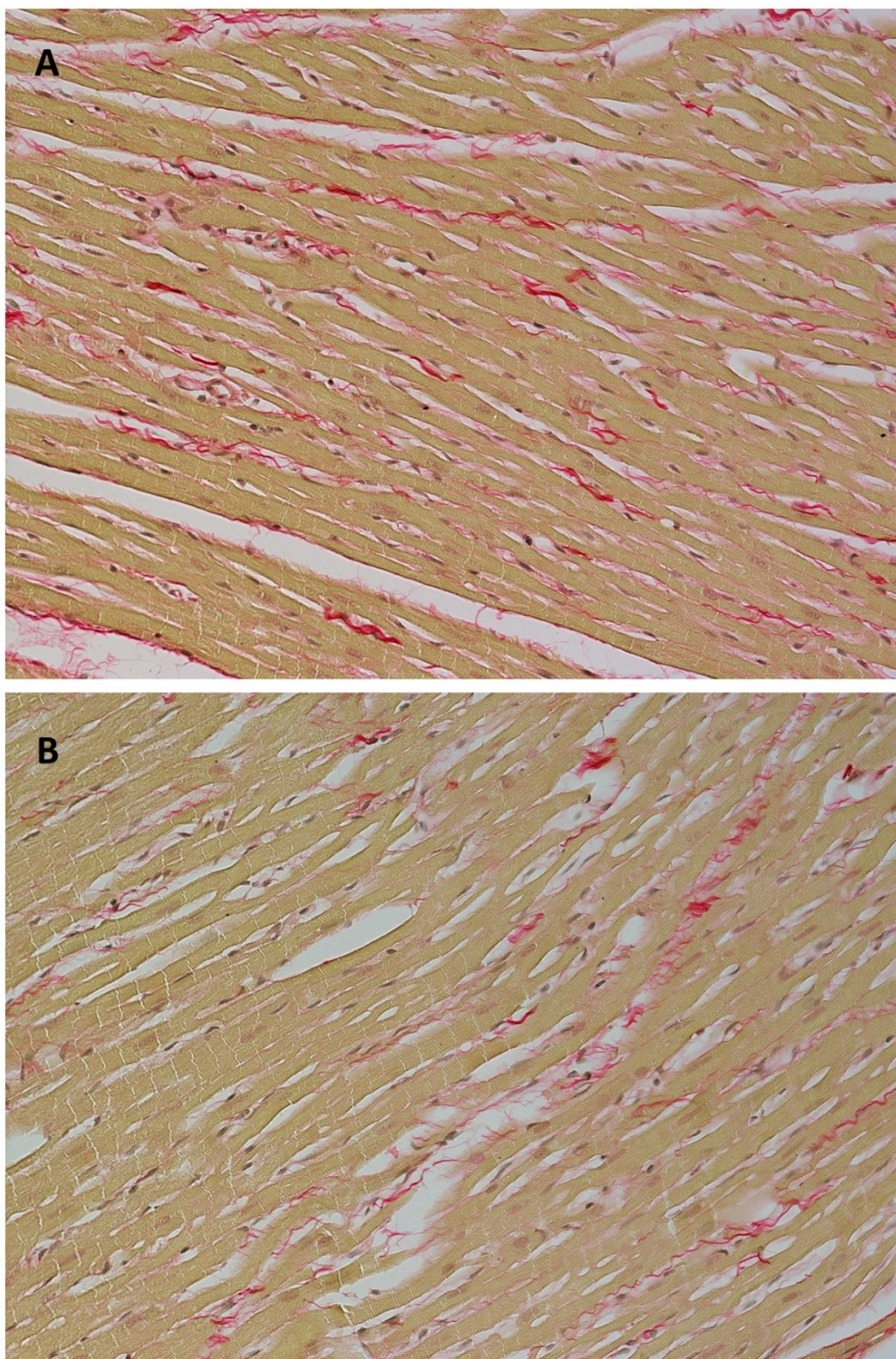


HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

* $P < 0.05$ vs. nativní srdce po ACF v příslušném čase

Graf 3. 9. Změny šířky kardiomyocytů v levé komoře po HTx selhávajícího srdce



Obr. 3. 4. Reprezentativní histologické preparáty z levé komory (A) zdravého myokardu a (B) selhávajícího myokardu. Barveno pikrosírovou červení na přítomnost kolagenu (zvětšení 200x).

Měřením rozsahu myokardiální fibrózy bylo zjištěno, že podíl fibrózy se významně nemění po Htx zdravého srdce ve srovnání s kontrolou (Graf 3. 4.). Podíl fibrózy byl signifikantně nižší v myokardu levé komory zvířat po navození srdečního selhání (Graf 3. 5. a Obr. 3. 4.).

Obdobně, jako u zdravého myokardu, nedošlo po HTx selhávajícího srdce ke statisticky významným změnám v zastoupení fibrózy ve svalovině levé komory (Graf 3. 6.).

Absolutní šířka kardiomyocytů byla v levé komoře zvířat po navození srdečního selhání následkem ACF signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny (Graf 3. 7.).

Následkem mechanického odlehčení myokardu po HTx dochází u zdravého srdce k rozvoji atrofie myokardu levé komory, čemuž odpovídá výrazný pokles šířky kardiomyocytů (Graf 3. 8.). Po HTx selhávajícího myokardu jsme taktéž pozorovali výrazný pokles šířky kardiomyocytů (Graf 3. 9.).

3.5. Diskuze

Naše výsledky potvrdily skutečnost, že po heterotopické transplantaci srdce, tedy po mechanickém odlehčení myokardu, dochází k rozvoji atrofie myokardu. Atrofické změny byly výraznější po mechanickém odlehčení selhávajícího myokardu. Atrofické změny byly pozorovány analogicky ve všech srdečních kompartmentech (levá komora + septum, pravá komora, celé srdce). Pozorované výsledky jsou ve shodě s předchozími studiemi (Oriynhan W.et al., 2007, Rakušan K.et al., 1997, Kolář F.et al., 1996, Liu Y.et al., 2015)

Tato zjištění potvrdila naši domněnku, že rozvoj atrofie myokardu následkem mechanického odlehčení selhávajícího myokardu může patřit mezi zásadní faktory ovlivňující průběh reverzní remodelace u humánních pacientů léčených mechanickými srdečními podporami. Progrese srdeční atrofie, zejména následkem dlouhodobého působení mechanického odlehčení prostřednictvím dlouhodobých VAD, je řadou autorů považována za zásadní překážku, která ovlivňuje globální zlepšení funkce myokardu a případně až zotavení myokardu (Pokorný M.et al., 2014, Bruggink A. H.et al., 2006, Baskin K. B. a Taegtmeyer H., 2011). A to i přes průkaz řady pozitivních ultrastrukturálních změn, které následují po mechanickém odlehčení selhávajícího srdce a nasvědčují průběhu reverzní remodelace myokardu (Drakos S. G.et al., 2016, Drakos S. G.et al., 2012).

Jako model srdečního selhání pro naši práci, jsme zvolili srdeční selhání na podkladě objemového přetížení, které nastane po založení ACF na dobu 10 týdnů. Pro tento model je charakteristické zvětšení velikosti kardiomyocytů, což jsme prokázali, v souladu s předchozími pracemi, (Beneš J.et al., 2011) zjištěným nárůstem šířky kardiomyocytů. Prokázali jsme také, že na rozdíl od experimentálních modelů srdečního

selhání na podkladě tlakového přetížení, případně ischemické kardiomyopatie, nebylo v našem případě srdeční selhání doprovázeno rozvojem myokardiální fibrózy.

Dalším zjištěním bylo, že ani po mechanickém odlehčení myokardu, tedy po HTx srdce, nedošlo v žádné ze skupin ke statisticky signifikantní změně podílu vazivové tkáně v myokardu. Toto zjištění bylo v rozporu s některými studiemi, které dokumentují zvýšenou koncentraci kolagenu jako následek dlouhodobého mechanického odlehčení myokardu (Muranaka H. et al., 2010). Současně některé klinické i experimentální práce poukazují na zvýšený podíl myokardiální fibrózy v souvislosti se srdečním selháním, zmnožení vazivové tkáně je všeobecně považováno za příčinu diastolické dysfunkce a zhoršené kontraktility (Braunwald E., 2015). Podíl myokardiální fibrózy je však pravděpodobně odvislý od etiologie terminálního srdečního selhání, která je značně rozdílná. V této souvislosti je nutné zmínit, že majoritní příčinou terminálního srdečního selhání je ischemická kardiomyopatie, a právě té se věnuje většina klinických i experimentálních studií. Se srdečním selháním na podkladě chronického objemového přetížení se však setkáváme i v klinické praxi např. následkem mitrální regurgitace. Velkou výhodou námi zvoleného modelu srdečního selhání je postupná progresse srdečního selhání s možností aktivace kompenzačních mechanismů a postupně se rozvíjející aktivace neurohumorálního systému, retence tekutin a renální insuficience. Postupně tak dochází k přechodu z asymptomatického stádia (tedy kompenzovaného) do dekompenzované terminální fáze srdečního selhání s rozvojem multiorgánového selhání (Melenovský V. et al., 2012). Rozsah myokardiální fibrózy a její případné zmožení následkem mechanického odlehčení myokardu je stále předmětem zkoumání. Vzhledem k heterogenní etiologii srdečního selhání pacientů léčených mechanickými srdečními podporami nepanuje na tomto poli jednoznačný konsensus (Soppa G. K. R. et al., 2008, Maybaum S. et al., 2007).

Naše výsledky přinášejí nový pohled na zastoupení myokardiální fibrózy po mechanickém odlehčení selhávajícího myokardu s ohledem na etiologii srdečního selhání.

3.6. Souhrn výsledků

- A) Následkem mechanického odlehčení myokardu po heterotopické transplantaci srdce u laboratorního potkana dochází k rozvoji atrofie srdce s maximem atrofických změn již 14 dní po HTx.
- B) Průběh atrofických změn byl výrazně akcentován u selhávajícího myokardu. Tedy po heterotopické transplantaci srdce, u kterého bylo nejprve navozeno srdeční selhání (ACF po 10 týdnů).
- C) Atrofické změny probíhaly analogicky ve všech srdečních oddílech.
- D) Prokázali jsme, že u námi používaného experimentálního modelu srdečního selhání (objemové přetížení po založení ACF) nedochází ke zmnožení procentuálního podílu fibrózní tkáně.
- E) Heterotopická transplantace srdce, a tedy mechanické odlehčení srdce, nevedlo ke zvýšení podílu myokardiální fibrózy u zdravého ani selhávajícího myokardu.
- F) Vlivem objemového přetížení (ACF) došlo ke značnému nárůstu šířky kardiomyocytů.
- G) Heterotopická transplantace srdce vedla k signifikantnímu poklesu absolutní šířky kardiomyocytů u zdravého i selhávajícího myokardu, již po 7 dnech mechanického odlehčení.

4.Studie č. 2

Metabolické ovlivnění atrofie myokardu po heterotopické transplantaci srdce u laboratorního potkana

4.1. Úvod

Díky vysoké úrovni plasticity pozorované u myokardu může docházet v reakci na mechanické, neurohumorální, případně chemické signály k rozvoji hypertrofie nebo atrofie myokardu. Řada studií poukazuje na možnost úplné reverzibility adaptivních mechanismů rozvíjejících se v průběhu rozvoje srdečního selhání – tedy proces reverzní remodelace (Razeghi P.et al., 2003, Bloomekatz J.et al., 2016). Z klinického pohledu se jako velmi slibný zdá rozvoj fyziologické hypertrofie srdce. Tento jev byl popsán u Krajty tygrovitě (*Python molurus*) postprandiálně. Možnost navození fyziologické hypertrofie srdce by v klinické praxi mohla představovat úspěšnou strategii vedoucí k zotavení myokardu u pacientů léčených dlouhodobě VAD. U Krajty tygrovitě byl popsán fenomén, kdy po požití potravy dojde k rozvoji hypertrofie srdce (více než 40% nárůst hmotnosti levé komory) během 48 hodin. Celý tento děj je doprovázen mohutnou aktivací metabolismu mastných kyselin a nárůstem tkáňové koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové. Dle provedených studií se lze domnívat, že právě nárůst koncentrací mastných kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové je zodpovědný za rozvoj fyziologické hypertrofie srdce u Krajty tygrovitě (Riquelme C. A.et al., 2011). Stejný autorský kolektiv také prokázal, že podání infúze směsi kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové vede k rozvoji hypertrofie myokardu nejen u Krajty tygrovitě, ale také u normotenzní laboratorní myši (Riquelme C. A.et al., 2011).

V naší studii bylo navýšení koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové dosaženo krmením experimentálních zvířat izokalorickou vysokosacharózovou

dietou (70 % energetického příjmu sacharóza, 20 % bílkoviny, 10 % jiné sacharidy), která byla již v minulosti v naší laboratoři používána a u níž byl prokázán její vliv na koncentraci výše uvedených mastných kyselin (Cahova M. et al., 2012).

4.2. Cíle studie

- Potvrzení možnosti **zvýšení koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové v myokardu** prostřednictvím úpravy diety.
- Zjistit **vliv zvýšených koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové v myokardu na průběh rozvoje srdeční atrofie** po heterotopické transplantaci zdravého a selhávajícího srdce.

4.3. Metodika

4.3.1. *Laboratorní zvířata*

Pro veškeré experimenty byli použiti dospělí samci inbredního kmene laboratorního potkana *Lewis* o iniciální hmotnosti 270-290g (Charles River Laboratories, Velaz, Praha). Inbrední kmen byl zvolen, aby nebylo nutné po heterotopické transplantaci srdce podávat imunosupresiva. Laboratorní zvířata byla chována v režimu 12h den / 12h noc. Kontrolní skupina byla krmena standardním krmivem (0,45 % NaCl, 19-21 % bílkovin, SEMED, Praha). Experimentální zvířata byla krmena izokalorickou vysokosacharidovou dietou (70 % energetického příjmu sacharóza, 20 % bílkoviny, 10 % jiné sacharidy, SEMED, Praha).

Srdeční selhání bylo navozeno na podkladě objemového přetížení po založení ACF v infrarenálním segmentu abdominální aorty jehlovou technikou (Garcia R. a Diebold S., 1990).

4.3.2. *Heterotopická transplantace srdce*

Za účelem sledování atrofických změn následkem mechanického odlehčení myokardu byla jako experimentální model použita HTx srdce. Ve veškerých experimentech byla HTx srdce prováděna v konfiguraci částečného odlehčení myokardu (Obr. 1. 6.), obdobně jako v předchozí studii.

4.3.3. Experiment č. 1

Vliv izokalorické vysokosacharóзовé diety na tkáňovou koncentraci kyseliny palmitové, kyseliny palmitoolejové a kyseliny myristové u laboratorního potkana kmene Lewis

Cílem provedeného experimentu bylo zjistit, zda izokalorická vysokosacharóзовá dieta vede ke zvýšení koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové v myokardu po HTx srdce.

HTx srdce byla prováděna stejným způsobem jako v předchozím experimentu. Po celkové anestézii příjemce thiopentalem sodným (50 mg/kg tělesné hmotnosti, i.p.) byla provedena HTx srdce a dvou laloků pravé plíce od dárců, kterým byla nejprve podána inhalační anestézie (5% isofluran k uvedení do anestézie, a poté 2%). HTx srdce byla provedena jednak od zdravých dárců, tak od dárců po navození srdečního selhání (ACF 10 týdnů).

Po HTx srdce byla experimentálními skupinám podávána izokalorická vysokosacharóзовá dieta. V termínech 7, 14, 21 a 28 dní od HTx byl po terminální anestézii (midazolam 5 mg/kg + ketamin 50 mg/kg) proveden odběr srdcí, ve kterých byla měřena koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové pomocí plynové chromatografie. Lipidy z myokardu levé komory byly extrahovány chloroformem a separovány pomocí tenkovrstvé chromatografie za použití směsi hexanu, dietyléteru a kyseliny octové (80:20:3) jako solventu. Následně byly estery lipidů transmetylvány

metanolem. Metyl estery mastných kyselin byly separovány plynovou chromatografií, s vodíkem jako nosným plynem (HP 5890A GC, USA). Množství mastných kyselin je vyjádřeno jako procentuální podíl ze všech analyzovaných mastných kyselin.

Koncentrace mastných kyselin byla měřena 7, 14, 21 a 28 dní po HTx srdce.

Tabulka 4. 1. Přehled experimentálních skupin ve studii č. 2., experiment č. 1

HTx = heterotopická transplantace srdce

Intervence	Čas od HTx	Skupina
Kontrolní skupina – HTx zdravé srdce	1 týden	HTx zdravého srdce + běžná dieta
	2 týdny	HTx zdravého srdce + běžná dieta
	3 týdny	HTx zdravého srdce + běžná dieta
	4 týdny	HTx zdravého srdce + běžná dieta
Kontrolní skupina – HTx selhávající srdce	1 týden	HTx selhávajícího srdce + běžná dieta
	2 týdny	HTx selhávajícího srdce + běžná dieta
	3 týdny	HTx selhávajícího srdce + běžná dieta
	4 týdny	HTx selhávajícího srdce + běžná dieta
HTx zdravé srdce + dieta	1 týden	HTx zdravého srdce + vysokosacharózová dieta
	2 týdny	HTx zdravého srdce + vysokosacharózová dieta
	3 týdny	HTx zdravého srdce + vysokosacharózová dieta
	4 týdny	HTx zdravého srdce + vysokosacharózová dieta
HTx selhávající srdce + dieta	1 týden	HTx selhávajícího srdce + vysokosacharózová dieta
	2 týdny	HTx selhávajícího srdce + vysokosacharózová dieta
	3 týdny	HTx selhávajícího srdce + vysokosacharózová dieta
	4 týdny	HTx selhávajícího srdce + vysokosacharózová dieta

4.3.4. Experiment č. 2

Vliv zvýšené myokardiální koncentrace kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové na rozvoj atrofických změn po HTx srdce u laboratorního potkana kmene Lewis

Ve druhé studii jsme studovali vliv zvýšené koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové na rozvoj atrofie myokardu po mechanickém odlehčení.

HTx srdce byla prováděna stejným způsobem jako v předchozích experimentech. Po celkové anestézii příjemce thiopentalem sodným (50 mg/kg tělesné hmotnosti, i.p.) byla provedena HTx srdce a dvou laloků pravé plíce od dárců, kterým byla nejprve podána inhalační anestézie (5% isofluran k uvedení do anestézie, a poté 2%). HTx srdce byla provedena jednak od zdravých dárců, tak od dárců po navození srdečního selhání. Po HTx srdce byla experimentálními skupinám podávána izokalorická vysokosacharózová dieta, kontrolní skupiny byly krmeny běžnou dietou.

V časových úsecích 7, 14, 21 a 28 dní od HTx byl, po terminální anestézii (midazolam 5 mg/kg + ketamin 50 mg/kg), proveden odběr heterotopicky transplantovaných srdcí, případně nativních srdcí, k histopatologické analýze nebo vážení jednotlivých kompartmentů.

Srdeční atrofie byla hodnocena jako úbytek hmotnosti celého srdce (HW), levé komory (LVW) včetně interventrikulárního septa a pravé komory (RVW). Každá skupina byla tvořena 9 zvířaty. Úroveň atrofie byla vyjádřena poměrem hmotnosti heterotopicky transplantovaného srdce nebo jeho kompartmentů k příslušným hmotnostem kontrolní skupiny. Kontrolní skupinou pro heterotopicky transplantovaná normální srdce byla nativní ortotopická srdce skupiny sham. Jako kontrolní skupina pro heterotopicky transplantovaná srdce po navození srdečního selhání sloužila nativní srdce od zvířat po navození srdečního selhání v příslušném týdnu. Pro účely vážení celého srdce a jednotlivých srdečních oddílů

byla po explantaci ze srdce šetrně vytlačena zbylá krev a následně bylo srdce rozděleno na levou komoru + septum a pravou komoru. Poměry hmotností byly následně normalizovány k délce tibie příslušného zvířete s cílem minimalizace dopadu rozdílného vzrůstu jednotlivých laboratorních potkanů (Yin F. C. P. et al., 1982).

Ihned po terminální anestézii byla provedena preparace orgánů, jejich perfuze kardioplegickým roztokem (St. Thomas) a následně perfuze a fixace 4% roztokem paraformaldehydu. Fixované vzorky byly umístěny do Tissue-Tek bločků a podrobeny histopatologické analýze, byla měřena zejména šířka a délka kardiomyocytů. Po obarvení vzorků pikrosírovou červení bylo měřeno zastoupení intersticiální fibrózy v levé a pravé komoře. Rozsah myokardiální fibrózy byl vyjádřen procentuálně pomocí semikvantitativní analýzy (zvětšení 200x, program NIS-Elements Ar). Pro účely vážení srdečních kompartmentů byly použity separátní skupiny zvířat, protože fixační činidla pro histopatologickou analýzu by mohla výsledek ovlivnit. Každou skupinu tvořilo 9 zvířat.

Tabulka 4. 2. Přehled experimentálních skupin ve studii č. 2., experiment č. 2
HTx = heterotopická transplantace srdce, ACF = Aorto-kavální píštěl

Intervence	Čas od HTx	Skupina
		Nativní zdravé srdce 10 týdnů po sham operaci - kontrola
Heterotopická transplantace zdravé srdce	1 týden	HTx zdravého srdce + běžná dieta
	2 týdny	HTx zdravého srdce + běžná dieta
	3 týdny	HTx zdravého srdce + běžná dieta
	4 týdny	HTx zdravého srdce + běžná dieta
Heterotopická transplantace selhávající srdce	1 týden	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů) + běžná dieta
	2 týdny	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů) + běžná dieta
	3 týdny	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů) + běžná dieta
	4 týdny	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů) + běžná dieta
Heterotopická transplantace zdravé srdce + dieta	1 týden	HTx zdravého srdce + vysokosacharózová dieta
	2 týdny	HTx zdravého srdce + vysokosacharózová dieta
	3 týdny	HTx zdravého srdce + vysokosacharózová dieta
	4 týdny	HTx zdravého srdce + vysokosacharózová dieta
Heterotopická transplantace selhávající srdce + dieta	1 týden	HTx selhávajícího srdce + vysokosacharózová dieta
	2 týdny	HTx selhávajícího srdce + vysokosacharózová dieta
	3 týdny	HTx selhávajícího srdce + vysokosacharózová dieta
	4 týdny	HTx selhávajícího srdce + vysokosacharózová dieta
Nativní selhávající srdce	X	Nativní selhávající srdce (ACF 10 týdnů) + běžná dieta
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 11 týdnů) + běžná dieta
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 12 týdnů) + běžná dieta
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 13 týdnů) + běžná dieta
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 14 týdnů) + běžná dieta
Nativní selhávající srdce + dieta	X	Nativní selhávající srdce (ACF 11 týdnů) + vysokosacharózová dieta
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 12 týdnů) + vysokosacharózová dieta
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 13 týdnů) + vysokosacharózová dieta
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 14 týdnů) + vysokosacharózová dieta

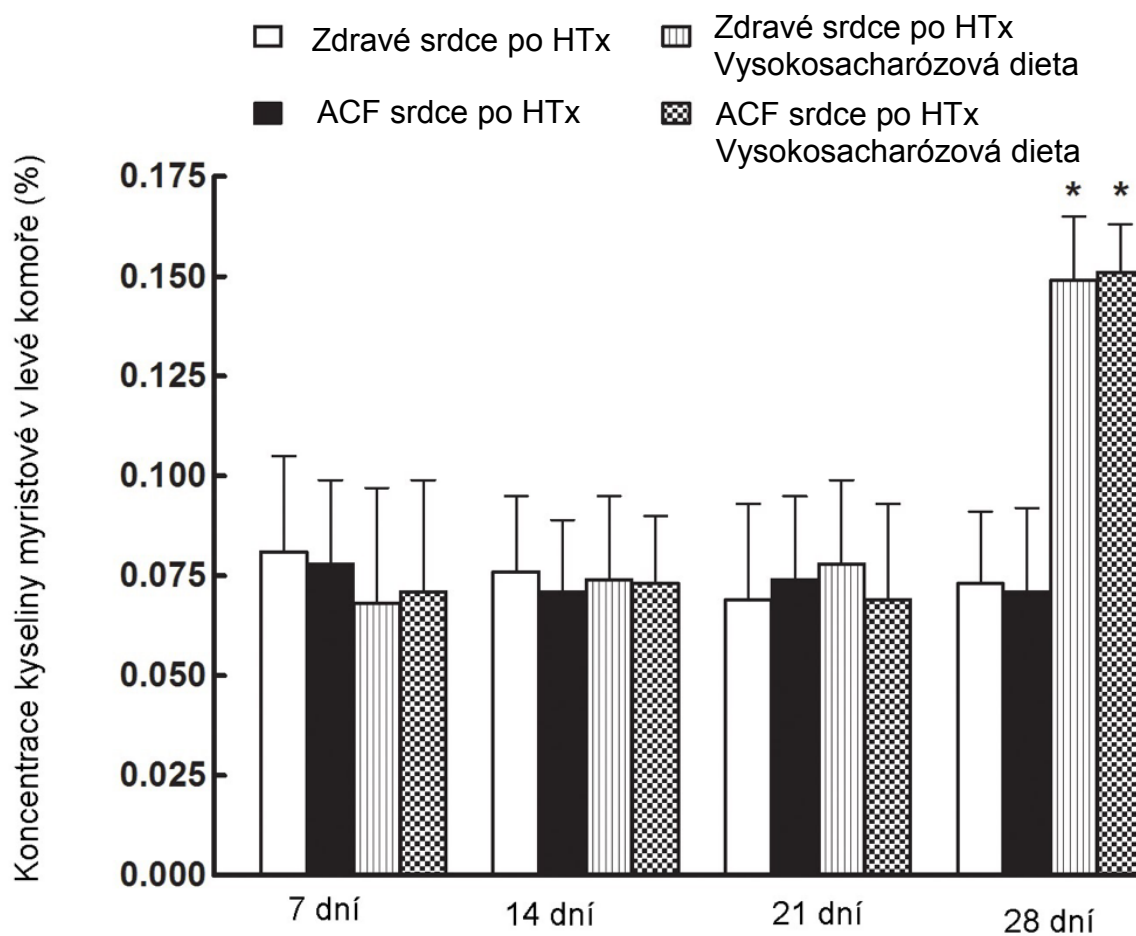
4.4. Statistická analýza výsledků

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standardní chyba průměru), n představuje počet zvířat ve skupině. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty, které překročili 95% hranici pravděpodobnosti ($p < 0,05$). K vyhodnocení výsledků byl použit Studentův t -test a Wilcoxonův test, případně ANOVA. Ke statistické analýze dat byl použit program Graph-Pad Prism 7 (Graph Pad Software, San Diego, USA).

4.5. Výsledky

V prvním experimentu jsme sledovali změny v koncentraci kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové v myokardu po podávání vysokosacharóзовé izokalorické diety ve srovnání s běžnou dietou. Z Grafu 4. 1. je patrné, že po vysokosacharóзовé dietě dochází ke statisticky významnému nárůstu koncentrace kyseliny myristové, jak v myokardu 28 dní po HTx zdravého srdce, tak v myokardu 28 dní po HTx selhávajícího srdce.

Z grafů 4. 2. a 4. 3. je patrný nárůst koncentrací kyseliny palmitové a palmitoolejové u skupin na vysokosacharóзовé dietě, který byl pozorován již mnohem dříve než v případě kyseliny myristové, a to již po 7 dnech od HTx srdce.

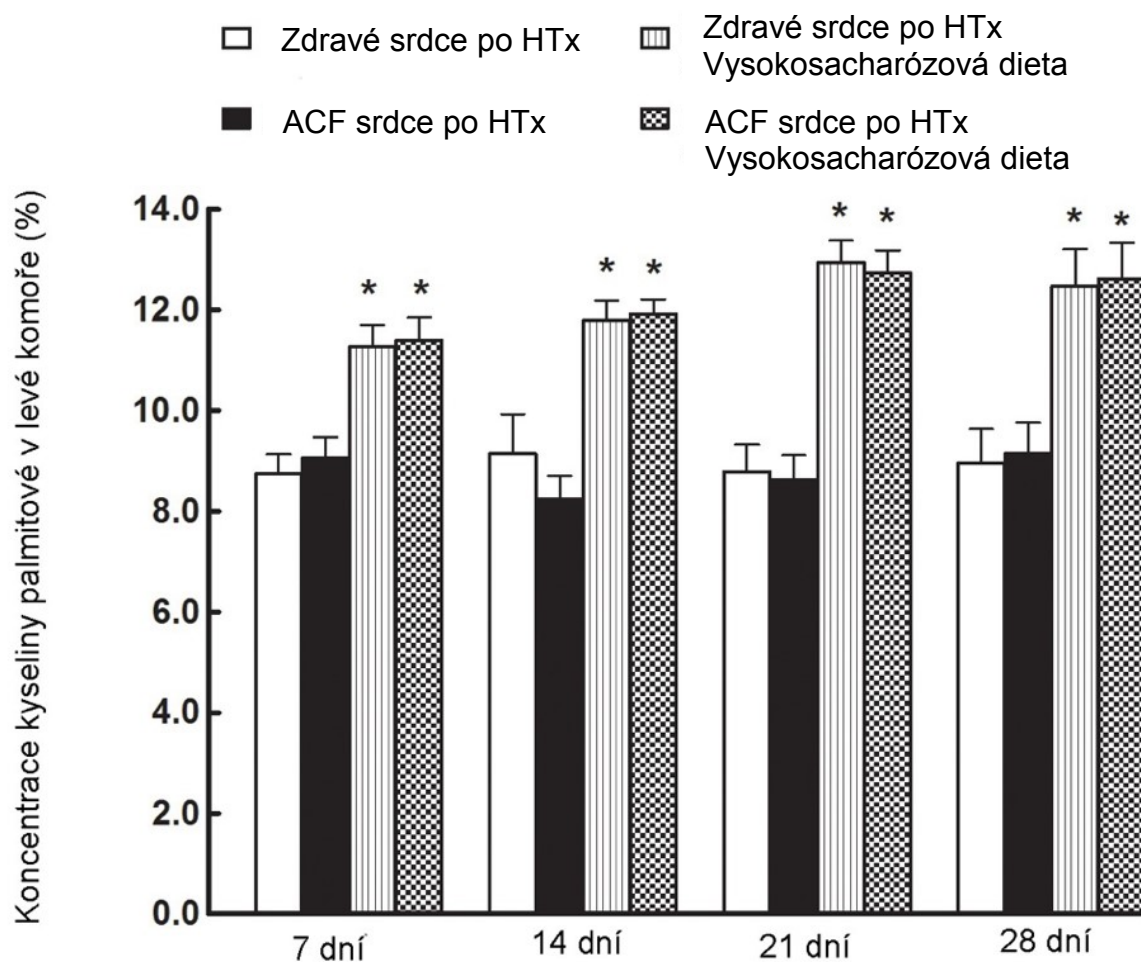


HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

* $P < 0.05$ vs. zdravé a selhávající srdce zvířat krmených běžnou dietou v příslušném čase

Graf 4. 1. Koncentrace kyseliny myristové v levé komoře heterotopicky transplantovaného zdravého a selhávajícího srdce (vyjádřeno jako procentuální zastoupení ze všech analyzovaných mastných kyselin) u zvířat krmených běžnou a vysokosacharózovou dietou.

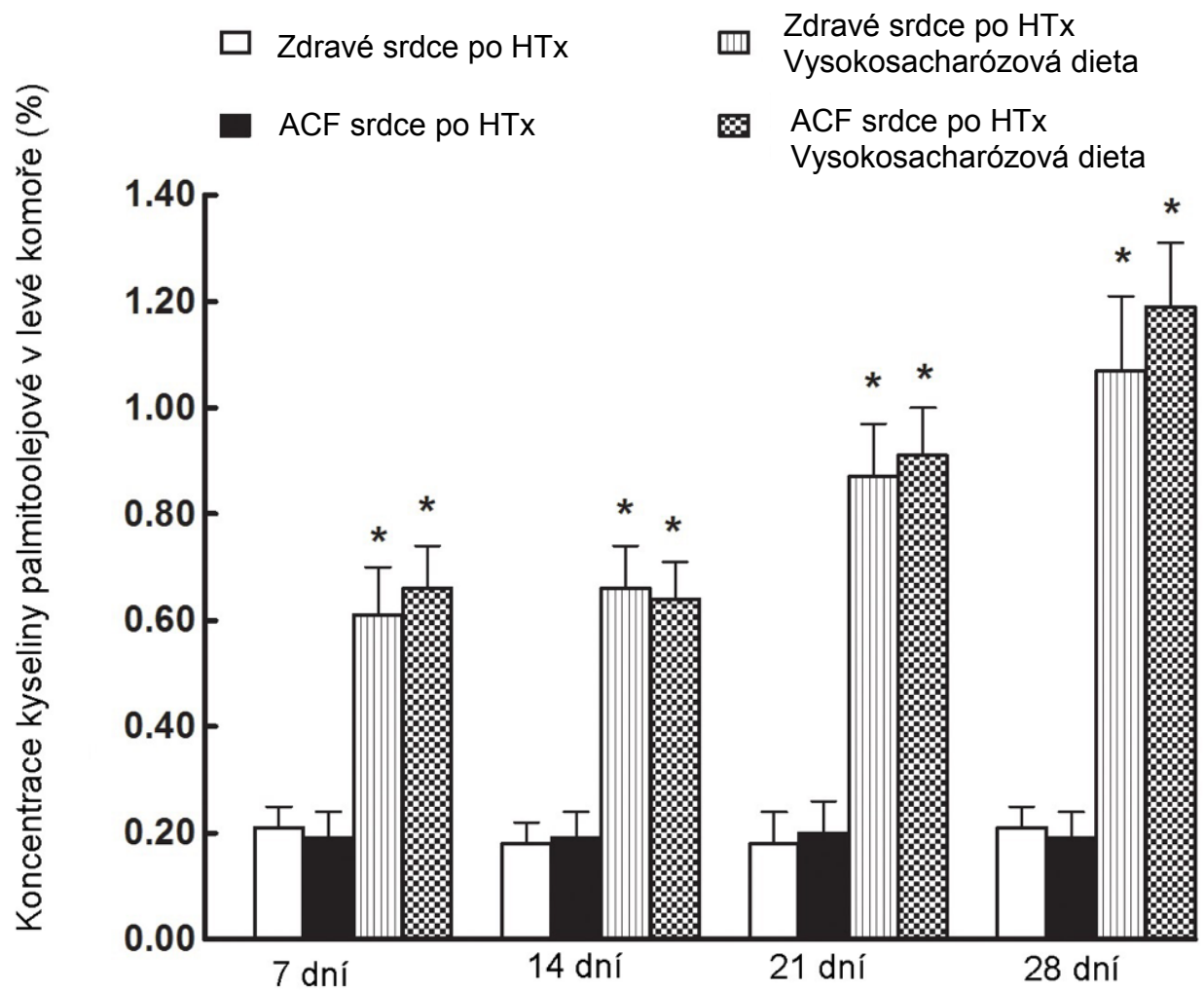


HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

* $P < 0.05$ vs. zdravé a selhávající srdce zvířat krměných běžnou dietou v příslušném čase

Graf 4. 2. Koncentrace kyseliny palmitové v levé komoře heterotopicky transplantovaného zdravého a selhávajícího srdce (vyjádřeno jako procentuální zastoupení ze všech analyzovaných mastných kyselin) u zvířat krměných běžnou a vysokosacharózovou dietou.



HTx = heterotopická transplantace srdce

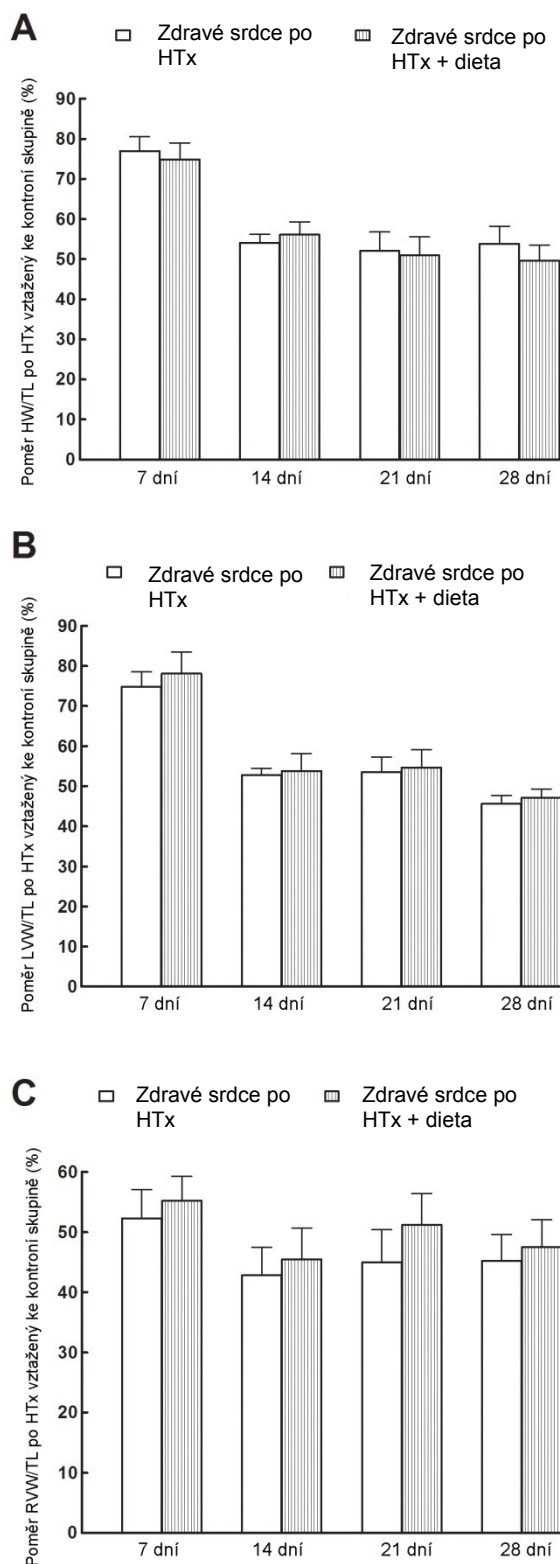
ACF = aorto-kavální píštěl

* $P < 0.05$ vs. zdravé a selhávající srdce zvířat krmených běžnou dietou v příslušném čase

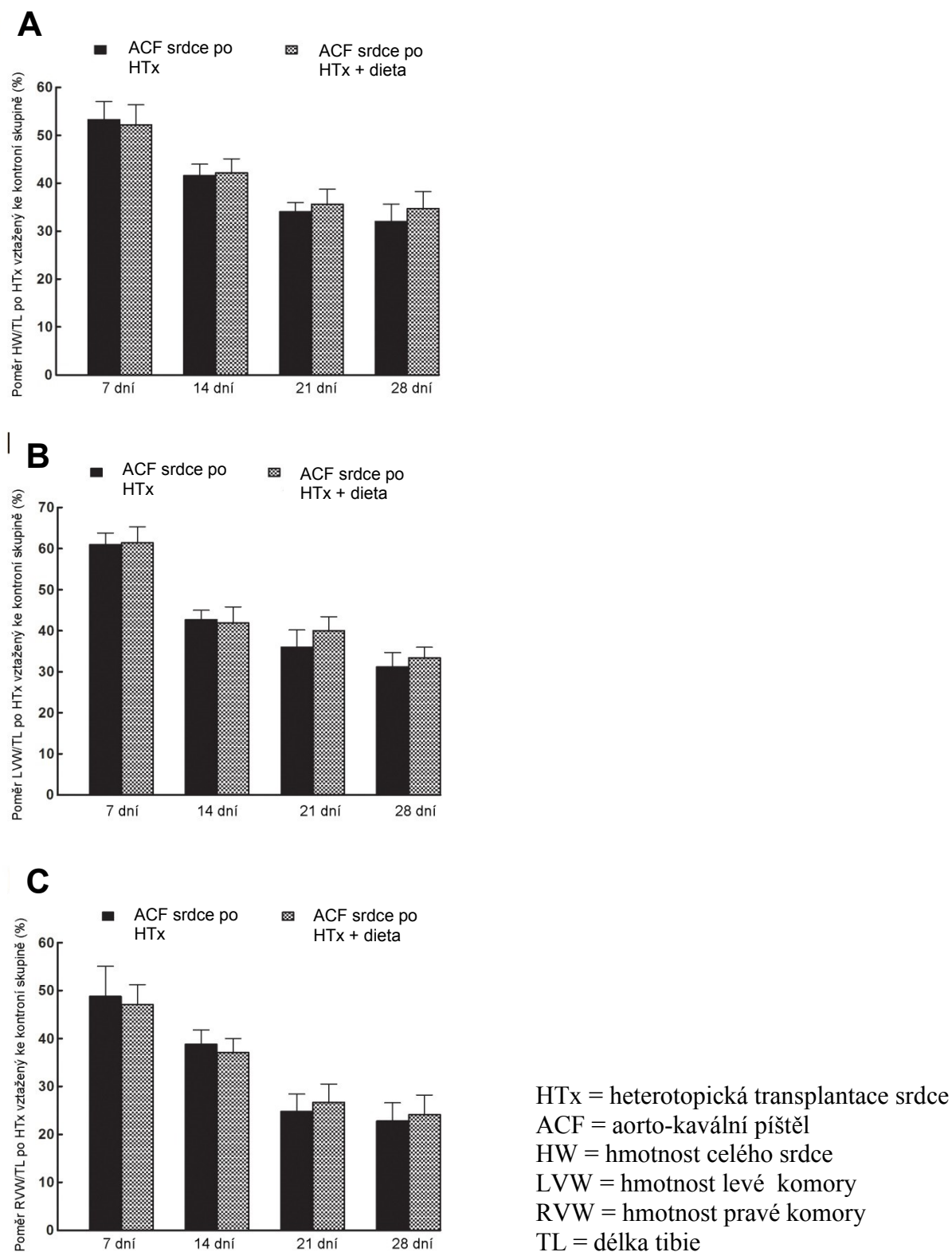
Graf 4. 3. Koncentrace kyseliny palmitoolejové v levé komoře heterotopicky transplantovaného zdravého a selhávajícího srdce (vyjádřeno jako procentuální zastoupení ze všech analyzovaných mastných kyselin) u zvířat krmených běžnou a vysokosacharózovou dietou.

Graf 4. 4. A prezentuje průběh atrofických změn po HTx zdravého srdce. Sledovali jsme výrazný váhový úbytek již 7 dní po HTx (o 23 ± 3 %), který byl ještě významnější po 14 dnech od HTx srdce (o 46 ± 2 %). Změny v úbytku hmotnosti jsme pozorovali jak u levé (Graf 4. 4. B), tak pravé komory srdeční (Graf 4. 4. C). Z naměřených hodnot vyplývá, že v případě pravé komory dochází k rozvoji atrofie po HTx rychleji než v případě levé komory. Sledovali jsme zde úbytek hmotnosti o 47 ± 5 % již 7. den od HTx srdce. Ze získaných dat vyplývá, že zvýšení koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové vlivem vysokosacharózové diety neovlivňuje rozvoj atrofických změn po HTx zdravého srdce (Graf 4. 4.).

Grafy 4. 5. A-C prezentují změny hmotnosti celého srdce, levé komory a pravé komory po HTx srdce po navození srdečního selhání. Po HTx selhávajícího srdce jsme pozorovali obdobné změny jako ve skupině heterotopicky transplantovaných zdravých srdcí, avšak váhový úbytek byl o cca 20 % výraznější. Z výsledků vyplývá, že zvýšení koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové vlivem vysokosacharózové diety neovlivňuje rozvoj atrofických změn po HTx selhávajícího srdce (Graf 4. 5.).



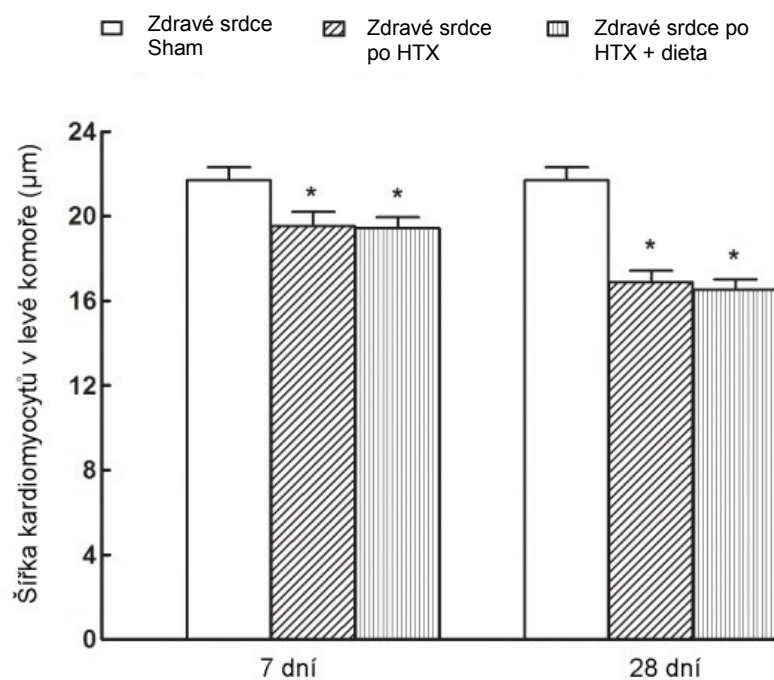
Graf 4. 4. Vliv vysokosacharóзовé diety na rozvoj srdeční atrofie po HTx zdravého srdce. Změny hmotnosti: (A) celého srdce, (B) levé komory, (C) pravé komory.



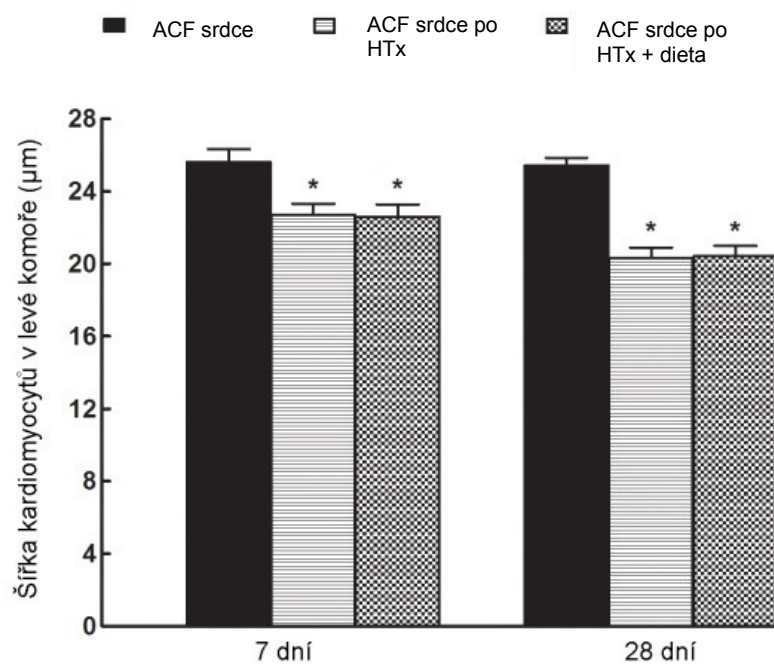
Graf 4. 5. Vliv vysokosacharóзовé diety na rozvoj srdeční atrofie po Htx selhávajícího srdce.

Změny hmotnosti: (A) celého srdce, (B) levé komory, (C) pravé komory.

A



B



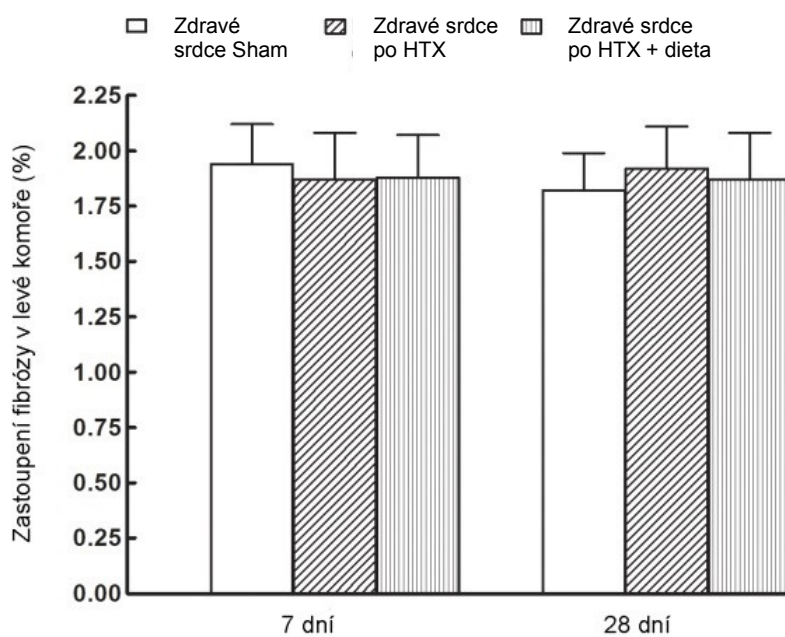
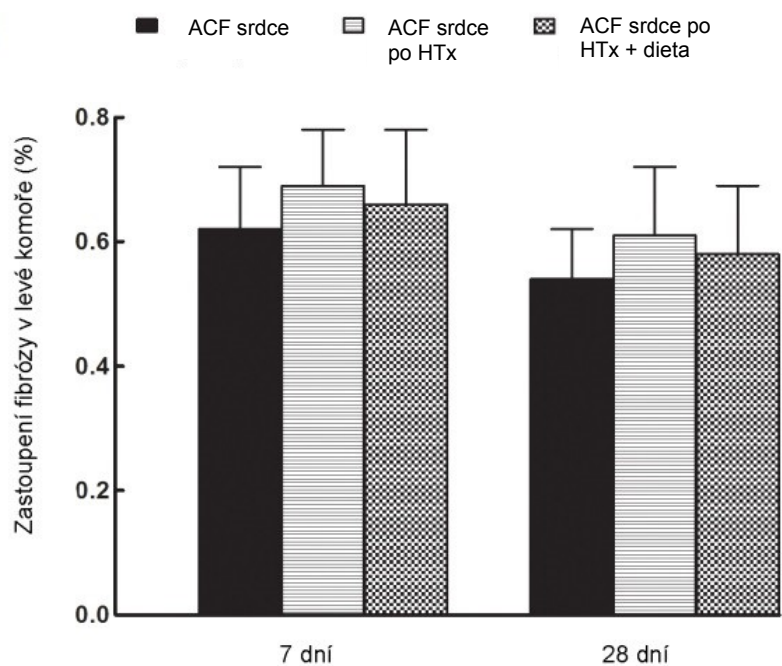
HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

* $P < 0.05$ vs. nativní zdravé srdce resp. srdce po ACF 10 týdnů

Graf 4. 6. Vliv vysokosacharóзовé diety na šířku kardiomyocytů po HTx

(A) zdravého a (B) selhávajícího srdce.

A**B**

HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

Graf 4. 7. Vliv vysokosacharóзовé diety na procentuální zastoupení fibrózy v levé komoře po HTx (A) zdravého a (B) selhávajícího srdce.

Graf 4. 6. A prezentuje změny absolutní šířky kardiomyocytů levé komory zdravých srdcí po HTx. Porovnávali jsme šířku kardiomyocytů u skupin zvířat krmených standardní a izokalorickou vysokosacharózovou dietou. Z výsledků je patrné, že mechanické odlehčení myokardu vede k rozvoji výrazné atrofie kardiomyocytů levé komory. Pozorovali jsme statisticky signifikantní pokles šířky kardiomyocytů, který však nebyl ovlivněn vysokosacharózovou dietou, tedy navýšením koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové.

Ve skupině heterotopicky transplantovaných srdcích po navození srdečního selhání jsme pozorovali obdobný trend poklesu šířky kardiomyocytů. Ani ve skupině heterotopicky transplantovaných selhávajících srdcí nebyl prokázán vliv vysokosacharózové diety na průběh atrofických změn (Graf 4. 6. B).

Podíl myokardiální fibrózy v pravé a levé komoře po HTx zdravého srdce je znázorněn v Grafu 4. 7. A. Percentuální zastoupení fibrózy v levé komoře po HTx selhávajícího myokardu je znázorněn v Grafu 4. 7. B. Bylo zjištěno, že podíl myokardiální fibrózy je po 7 dnech mechanického odlehčení signifikantně nižší v levé komoře selhávajícího myokardu ve srovnání s heterotopicky transplantovaným zdravým srdcem.

Expozice vysokosacharózové dietě, tedy navýšení koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové, nevedla ke statisticky významným změnám v zastoupení fibrózy u žádné ze sledovaných skupin v žádném časovém úseku.

4.6. Diskuze

Prvním podstatným zjištěním naší studie byl průkaz, že izokalorická vysokosacharózová dieta vede u laboratorního potkana kmene *Lewis* k výraznému zvýšení koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové v myokardu heterotopicky transplantovaných srdcí. Možnost dietního ovlivnění koncentrací výše uvedených

mastných kyselin se jeví jako velmi slibná v kontextu publikovaných prací (Riquelme C. A. et al., 2011).

Autoři zde dokumentují rozvoj postprandiální hypertrofie myokardu u Krajty tygrovité, která je doprovázena nárůstem koncentrace kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové v plazmě i svalovině levé komory srdeční. Současně autoři dokumentují signifikantní nárůst hmotnosti srdce po infúzi tří výše uvedených mastných kyselin. Z našeho pohledu se jeví jako nejvýznamnější publikované zjištění, že po 7 denní infúzi kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové normotenzním laboratorním myším dochází k výraznému zvýšení hmotnosti levé komory srdeční. Podávání směsi jiných mastných kyselin (olejové, linolové a arachidonové), ve shodné koncentraci, jaká byla postprandiálně naměřena u Krajty tygrovité, k rozvoji hypertrofie myokardu u laboratorní myši nevede. Z uvedeného lze vyvodit, že navýšení koncentrací právě kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové může vést k rozvoji fyziologické hypertrofie myokardu, což by otvíralo nové možnosti léčby pokročilých forem srdečního selhání.

V kontextu výše uvedeného by se dalo domnívat, že námi naměřené zvýšení koncentrací kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové v myokardu, po podávání izokalorické vysokosacharóзовé diety, povede ke zmírnění atrofických změn vyvolaných mechanickým odlehčením myokardu po heterotopické transplantaci srdce. Uvedená hypotéza by byla v souladu s literaturou, kde byla prezentována, navzdory všeobecnému přesvědčení, schopnost atrofických kardiomyocytů regenerovat v takové míře, že může dojít až k zotavení funkce srdce (Heckle M. R. et al., 2016).

Navzdory očekávání jsme však zjistili, že zvýšení koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové vlivem podávání vysokosacharóзовé diety, neovlivní rozvoj atrofie myokardu po HTx srdce v žádné z experimentálních skupin. Hypotetická nová

terapeutická modalita ovlivnění atrofie myokardu na podkladě dietou indukované fyziologické hypertrofie tak nebyla potvrzena.

V současné době bohužel nejsme schopni jednoznačně zdůvodnit selhání naší hypotézy. Proces postprandiální hypertrofie myokardu u Krajty tygrovitě byl dokumentován několika dalšími studiemi (Secor S. M. et al., 1995, Andersen J. B. et al., 2005). Na druhou stranu existují i experimentální studie prováděné s Krajtou tmavou (Slay C. E. et al., 2014), kde autoři poukazují na skutečnost, že k rozvoji postprandiální hypertrofie myokardu nedochází vždy. Další výzkumy prezentují dokonce nezměněnou postprandiální hmotnost srdce a dle autorů nedochází ani k ovlivnění kontraktility myokardu u Krajty královské (Enok S. et al., 2016).

Na podkladě současných studií lze usuzovat, že v indukcii postprandiální hypertrofie myokardu je zapojeno více signálních molekul než jen cirkulující mastné kyseliny. Současně se můžeme domnívat, že zvýšení práce myokardu hraje i v případě postprandiální hypertrofie srdce nezanedbatelnou úlohu (Slay C. E. et al., 2014).

Hormonální a metabolické faktory, jako například koncentrace kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové, mohou přispět k rozvoji fyziologické hypertrofie myokardu nebo zmírnění rozvoje srdeční atrofie po mechanickém odlehčení myokardu. Ve světle našich poznatků a recentních experimentálních studií lze takovým faktorům přisoudit pouze modulační úlohu. Bez adekvátního navýšení srdeční práce a zvýšení napětí ve stěně srdečních oddílů nedochází k rozvoji hypertrofie srdce. Navýšení koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové, v rozporu s naší hypotézou, nepředstavuje dostatečný stimul k aktivaci fyziologické hypertrofie. Nedochází tak ani ke zmírnění atrofických změn vyvolaných mechanickým odlehčením myokardu po heterotopické transplantaci srdce. Pro lepší porozumění bude nutné provést další experimentální studie,

které budou hodnotit zejména efekt kombinované metabolické a mechanické intervence na průběh atrofických změn po mechanickém odlehčení srdce.

4.7. Souhrn výsledků

1. Prokázali jsme možnost ovlivnění koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové pomocí dietní intervence, a to podáváním vysokosacharózové izokalorické diety.
2. Hypotetická možnost ovlivnění atrofických změn, při mechanickém odlehčení myokardu, pouhým zvýšením koncentrace kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové nebyla potvrzena.

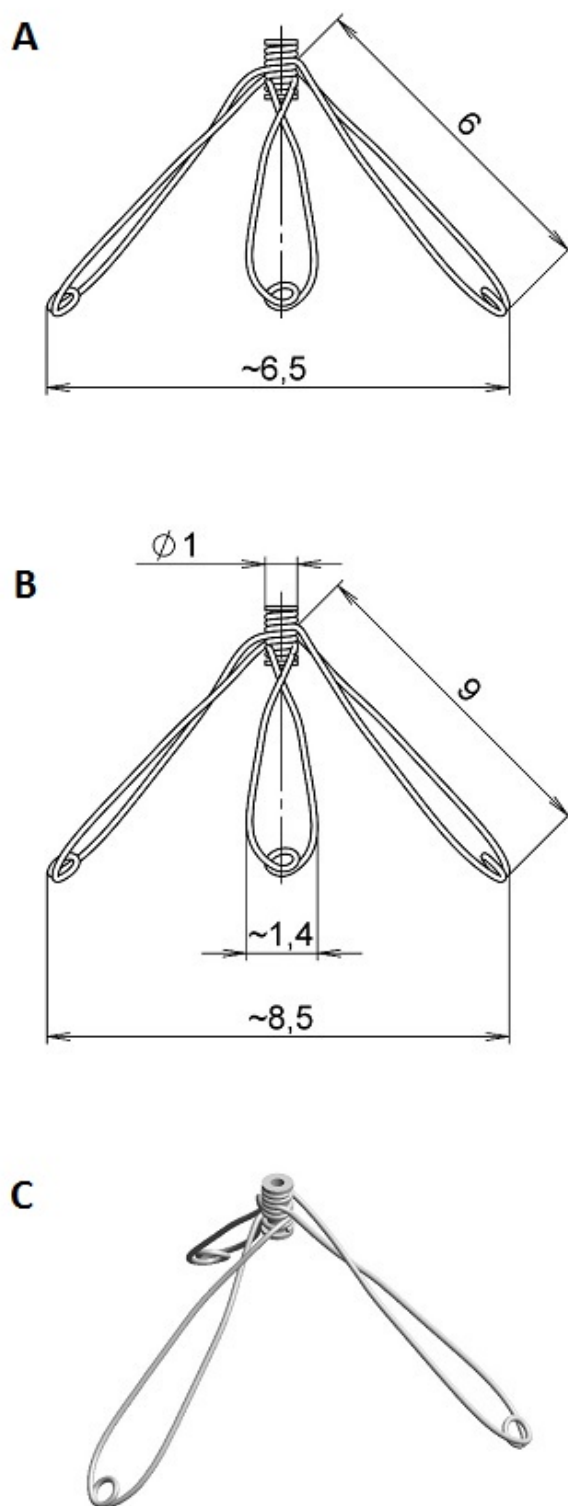
5.Studie č. 3

Mechanické ovlivnění atrofie myokardu po heterotopické transplantaci srdce u laboratorního potkana

5.1. Úvod

Z doposud uvedeného vyplývá pozitivní efekt zvýšení izovolumické zátěže myokardu ve vztahu k rozvoji srdeční atrofie. V minulosti užívané postupy, jako například zavedení latexového balónku naplněného fyziologickým roztokem do dutiny levé komory, by byly dnes v praxi nepoužitelné, vzhledem k obstrukci levé komory spolu se zamezením její ejekční funkce (Klein I., Hong C.et al., 1991). Z tohoto důvodu jsme vytvořili trojramenný expandér, který po implantaci do dutiny levé komory srdeční zvyšuje izovolumickou zátěž levé komory bez výrazného ovlivnění toku krve levou komorou a bez narušení ejekční funkce levé komory (Obr. 5. 1).

Vzledem k rozdílným velikostem srdečních oddílů zdravého srdce a srdce po navození srdečního selhání budeme v experimentu používat dvě velikosti implantabilních expandérů. Ke konstrukci expandérů byl použit ocelový drát o průměru 0,17 mm. Elastické a mechanické vlastnosti obou expandérů byly testovány *in vitro* (Lossef S. V.et al., 1994). Testy prokázaly, že elastické a plastické deformace vzniklé působením síly na oba typy expandérů jsou téměř totožné.



Obr. 5. 1. Schéma interventrikulárních expandérů (rozměry v mm)

A – expandér pro normální srdce

B – expandér pro srdce po navození srdečního selhání

C – 3D nákres expandéru

5.2. Cíl studie

- Sledovat **vliv zvýšení izovolumické zátěže myokardu** (po implantaci trojramenného expandéru do levé komory) **na rozvoj myokardiální atrofie** po HTx zdravého srdce a srdce po navození srdečního selhání.

5.3. Metodika

5.3.1. *Laboratorní zvířata*

Pro veškeré experimenty byli použiti dospělí samci inbredního kmene laboratorního potkana *Lewis* o hmotnosti 310-330g (Charles River Laboratories, Velaz, Praha). Inbrední kmen byl zvolen, aby nebylo nutné po HTx srdce podávat imunosupresiva. Laboratorní zvířata byla chována v režimu 12h den / 12h noc a krmena standardním krmivem (0,45 % NaCl, 19-21% bílkovin, SEMED, Praha).

Srdeční selhání bylo navozeno na podkladě objemového přetížení po založení aorto-kavální píštěle v infrarenálním segmentu abdominální aorty jehlovou technikou (Garcia R. a Diebold S., 1990). Jedná se o efektivní metodu ověřenou řadou výzkumných týmů (Oliver-Dussault C.et al., 2010, Beneš J.et al., 2011). Pro HTx byla odebírána srdce od dárců deset týdnů od vytvoření aorto–kavální píštěle.

5.3.2. *Heterotopická transplantace srdce*

Za účelem sledování atrofických změn následkem mechanického odlehčení myokardu byla jako experimentální model použita HTx srdce. Ve veškerých experimentech byla HTx srdce prováděna v konfiguraci částečného odlehčení myokardu (Obr. 1.5.), obdobně jako v předchozích studiích.

5.3.3. *Vliv zvýšení izovolumické zátěže myokardu prostřednictvím trojramenného ocelového expandéru na rozvoj atrofie po mechanickém odlehčení při HTx srdce*

V této studii byl sledován průběh atrofických změn po implantaci trojramenného expandéru v rámci HTx zdravého srdce a srdce po navození srdečního selhání. V první studii byl popsán rozvoj atrofických změn u neselhávajícího myokardu po HTx a následně změny po HTx srdce po navození srdečního selhání.

HTx srdce byla prováděna vždy ve stejné konfiguraci, tedy implantace srdce a dvou horních laloků pravé plíce se suturou ascendentní aorty štěpu na infrarenální segment abdominální aorty.

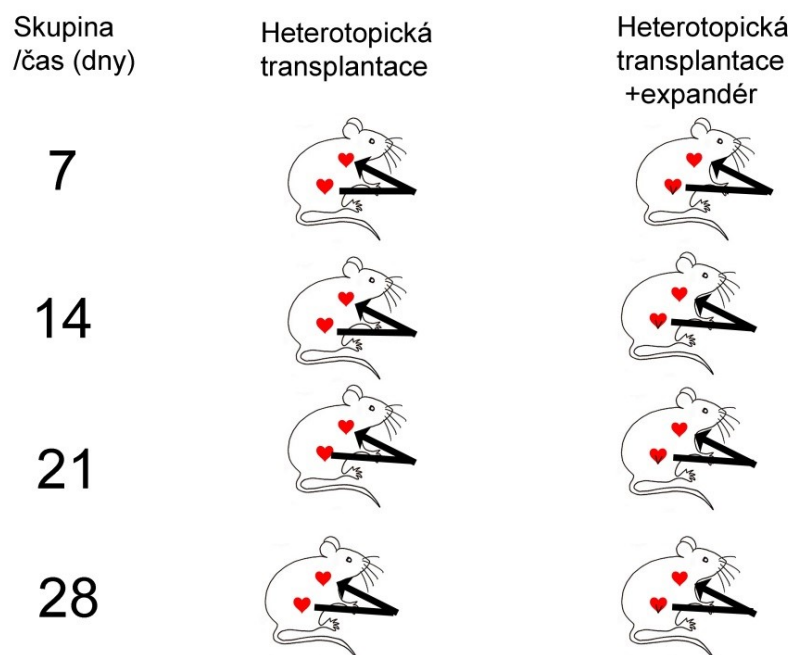
Rozdíl v operační technice oproti předchozím studiím spočíval v implantaci trojramenného expandéru do dutiny levé komory před transplantací srdce. V případě experimentální skupiny, u které byl implantován ocelový expandér do dutiny levé komory, byla implantace provedena ihned po aplikaci kardioplegického roztoku transapikálně a otvor v levé komoře byl uzavřen pomocí tabákových stehů s teflonovými podložkami. Na základě předchozích měření byly použity trojramenné expandéry dvou velikostí (s délkou ramen 6 mm pro zdravé srdce a 9 mm pro srdce po navození srdečního selhání).

V časových úsecích 7, 14, 21 a 28 dní od heterotopické transplantace byl, po terminální anestézii (midazolam 5 mg/kg + ketamin 50 mg/kg), proveden odběr heterotopicky transplantovaných srdcí, případně nativních srdcí k histopatologické analýze. U separátních skupin byla ihned po terminální anestézii provedena preparace orgánů a jejich perfuze kardioplegickým roztokem (St. Thomas) a následně perfuze a fixace 4% roztokem paraformaldehydu. Fixované vzorky byly umístěny do Tissue-Tek bločků a podrobeny histopatologické analýze, byla měřena zejména šířka a délka kardiomyocytů. Po obarvení vzorků pikrosírovou červení bylo měřeno zastoupení intersticiální fibrózy v levé

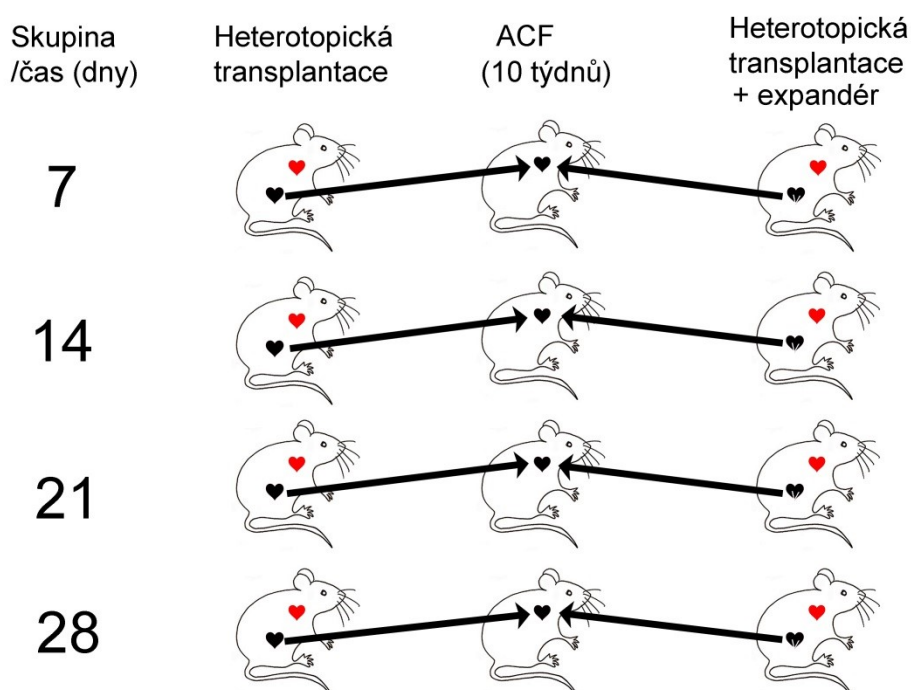
a pravé komoře. Podíl myokardiální fibrózy byl vyjádřen procentuálně pomocí semikvantitativní analýzy (zvětšení 200x, program NIS-Elements Ar). Každou skupinu tvořilo 8 zvířat.

Srdeční atrofie byla dále hodnocena jako úbytek hmotnosti celého srdce, levé komory včetně interventrikulárního septa a pravé komory. Míra atrofie byla vyjádřena poměrem hmotnosti heterotopicky transplantovaného srdce nebo jeho kompartmentů k příslušným hmotnostem kontrolní skupiny. Vzhledem k možnosti ovlivnění hmotnosti následkem použití fixačních činidel byly pro účely vážení a histopatologické analýzy použity separátní skupiny zvířat.

Kontrolní skupinou pro heterotopicky transplantovaná zdravá srdce byla nativní ortotopická srdce (Obr. 5. 2.). Jako kontrolní skupina pro heterotopicky transplantovaná srdce po navození srdečního selhání sloužila nativní srdce od zvířat po navození srdečního selhání v příslušném týdnu (tedy 10+1, 10+2, 10+3, 10+4 týden). (Obr. 5. 3.). Pro účely vážení celého srdce a jednotlivých srdečních oddílů byla po explantaci ze srdce šetrně vytlačena zbylá krev a následně bylo srdce rozděleno na levou komoru + septum a pravou komoru. Při vážení heterotopicky transplantovaných srdcí po implantaci expandéru byl nejprve odstraněn expandér z levé komory společně s teflonovými podložkami a stehy, kterými byl uzavřen hrot levé komory. Poměry hmotností byly následně normalizovány k délce tibie příslušného zvířete s cílem minimalizace dopadu rozdílného vzrůstu jednotlivých laboratorních potkanů (Yin F. C. P. et al., 1982).



Obr. 5. 2. Schéma pomocí šipek znázorňuje příslušné kontroly pro heterotopicky transplantovaná zdravá srdce a heterotopicky transplantovaná srdce po implantaci expandéru ve sledovaných časových úsecích.



Obr. 5. 3. Schéma pomocí šipek znázorňuje příslušné kontroly pro heterotopicky transplantovaná srdce po navození srdečního selhání (ACF – aorto-kavální zkrat) a heterotopicky transplantovaná srdce po implantaci expandéru ve sledovaných časových úsecích.

Tabulka 5. 1. Přehled experimentálních skupin ve studii č. 3

HTx = heterotopická transplantace srdce, ACF = Aorto-kavální píštěl

Intervence	Čas od HTx	Skupina
		Nativní zdravé srdce 10 týdnů po sham operaci - kontrola
Heterotopická transplantace zdravé srdce	1 týden	HTx zdravého srdce
	2 týdny	HTx zdravého srdce
	3 týdny	HTx zdravého srdce
	4 týdny	HTx zdravého srdce
Heterotopická transplantace selhávajícího srdce	1 týden	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů)
	2 týdny	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů)
	3 týdny	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů)
	4 týdny	HTx selhávajícího srdce (ACF 10týdnů)
Heterotopická transplantace zdravé srdce + expandér	1 týden	HTx zdravého srdce + expandér
	2 týdny	HTx zdravého srdce + expandér
	3 týdny	HTx zdravého srdce + expandér
	4 týdny	HTx zdravého srdce + expandér
Heterotopická transplantace selhávajícího srdce + expandér	1 týden	HTx selhávajícího srdce + expandér
	2 týdny	HTx selhávajícího srdce + expandér
	3 týdny	HTx selhávajícího srdce + expandér
	4 týdny	HTx selhávajícího srdce + expandér
Nativní selhávající srdce - kontrola	X	Nativní selhávající srdce (ACF 10 týdnů)
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 11 týdnů)
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 12 týdnů)
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 13 týdnů)
	X	Nativní selhávající srdce (ACF 14 týdnů)

5.3.4. Statistická analýza výsledků

Veškeré výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standardní chyba průměru), n představuje počet zvířat ve skupině. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty, které překročily 95% hranici pravděpodobnosti ($p < 0,05$). K vyhodnocení výsledků byl použit Studentův t -test a Wilcoxonův test, případně ANOVA. Ke statistické analýze dat byl použit program Graph-Pad Prism 7 (Graph Pad Software, San Diego, USA).

5.4. Výsledky

Tabulka 5. 2. shrnuje základní charakteristiky kontrolních skupin a prezentuje skutečnost, že v žádném ze sledovaných parametrů (hmotnost nativního srdce (HW), hmotnost pravé komory (RVW), hmotnost levé komory včetně septa (LVW)) se mezi sebou statisticky významně neliší. Hodnoty indexované na délku tibie (TL) tedy HW/TL, LVW/TL, RVW/TL představují kontrolní hodnoty (100%) v poměru vyjadřujícím atrofii myokardu po heterotopické transplantaci srdce. Percentuální podíl indexované hmotnosti heterotopicky transplantovaného srdce vztažený k ekvivalentní indexované hmotnosti ortotopicky uloženého nativního srdce sloužil jako základní indikátor rozvoje atrofie myokardu. Z prezentovaných dat také vyplývá hmotnostní přírůstek (BW) laboratorních zvířat v průběhu experimentu.

Tabulka 5. 3. prezentuje základní charakteristiky skupin po navození srdečního selhání vytvořením aorto-kavální píštěle. Z výsledků je patrné, že v průběhu 14 týdnů od vytvoření aorto-kavální píštěle dochází k rozvoji hypertrofie levé i pravé komory, což nasvědčuje progresi srdečního selhání. Zde uvedené hodnoty slouží jako kontrolní skupina pro heterotopicky transplanová srdce po navození srdečního selhání.

Parametry									
		BW	HW	LVW	RVW	HW/TL	LVW/TL	RVW/TL	
		(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/mm)	(mg/mm)	(mg/mm)	
Skupina									
Lewis 10 týdnů po sham operaci		320 ± 7	6055 ± 57	675 ± 14	219 ± 9	28.27 ± 0.81	18.03 ± 0.43	5.87 ± 0.23	
Lewis po heterotopické implantaci srdce (1 týden)		346 ± 9	677 ± 19	676 ± 19	217 ± 8	28.24 ± 0.79	17.98 ± 0.42	5.81 ± 0.22	
Lewis po heterotopické implantaci srdce (2 týdny)		341 ± 7	6014 ± 41	677 ± 18	204 ± 11	25.83 ± 0.86	17.34 ± 0.39	5.34 ± 0.27	
Lewis po heterotopické implantaci srdce (3 týdny)		356 ± 8	6126 ± 74	695 ± 19	214 ± 9	28.11 ± 0.88	17.35 ± 0.45	5.34 ± 0.29	
Lewis po heterotopické implantaci srdce (4 týdny)		360 ± 9*	6090 ± 99	706 ± 21	223 ± 11	27.98 ± 0.83	17.99 ± 0.41	5.72 ± 0.32	
Lewis po heterotopické implantaci srdce + expandér (1 týden)		324 ± 16	6055 ± 57	676 ± 26	212 ± 15	27.95 ± 0.91	17.86 ± 0.47	5.61 ± 0.37	
Lewis po heterotopické implantaci srdce + expandér (2 týdny)		337 ± 19	1045 ± 66	666 ± 25	209 ± 16	27.31 ± 0.93	17.43 ± 0.51	5.46 ± 0.41	
Lewis po heterotopické implantaci srdce + expandér (3 týdny)		379 ± 17*	1161 ± 82	729 ± 30	218 ± 18	29.36 ± 1.02	18.52 ± 0.91	5.54 ± 0.42	
Lewis po heterotopické implantaci srdce + expandér (4 týdny)		389 ± 14*	1117 ± 41	732 ± 31	218 ± 20	28.21 ± 0.91	18.49 ± 0.86	5.52 ± 0.39	

Tabulka 5. 2. Základní charakteristika skupin po heterotopické transplantaci ze
 tělesná hmotnost; hmotnost ortotopického (*in situ*) srdce a jednotlivých srdečních oddílů
 normalizované na délku tibiae
 Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM. BW, tělesná hmotnost; HW, hmotnost srdce
 pravé komory; TL, délka tibiae

Parametry		HW	LVW	RVW	HW/TL	LVW/TL	RVW/TL
		(g)	(mg)	(mg)	(mg/mm)	(mg/mm)	(mg/mm)
Skupina							
<i>Lewis</i> 10 týdnů od vytvoření ACF		386 ± 9	126 ± 4	467 ± 37	53.25 ± 1.19	31.72 ± 0.87	11.93 ± 0.58
<i>Lewis</i> 11 týdnů od vytvoření ACF		391 ± 9	136 ± 4	528 ± 38	57.09 ± 1.14*	32.99 ± 0.79*	13.12 ± 0.96*
<i>Lewis</i> 12 týdnů od vytvoření ACF		405 ± 8*	146 ± 4*	540 ± 41*	62.87 ± 1.11**	35.11 ± 0.89**	13.34 ± 0.89**
<i>Lewis</i> 13 týdnů od vytvoření ACF		435 ± 12*	155 ± 5*	675 ± 39*	65.74 ± 0.96* [@]	37.14 ± 0.61* [@]	16.63 ± 0.58* [@]
<i>Lewis</i> 14 týdnů od vytvoření ACF		405 ± 9	154 ± 4*	686 ± 41*	66.81 ± 0.88*	38.43 ± 0.52*	17.15 ± 0.61*

Tabulka 5. 3. Základní charakteristika skupin po založení aorto-kavální píštěle. Uvedena je

a jednotlivých srdečních oddílů vyjádřené jak v absolutních hodnotách, tak normalizované na délku

Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SEM. ACF, aorto-kavální píštěl; BW, tělesná hmotnost; HW

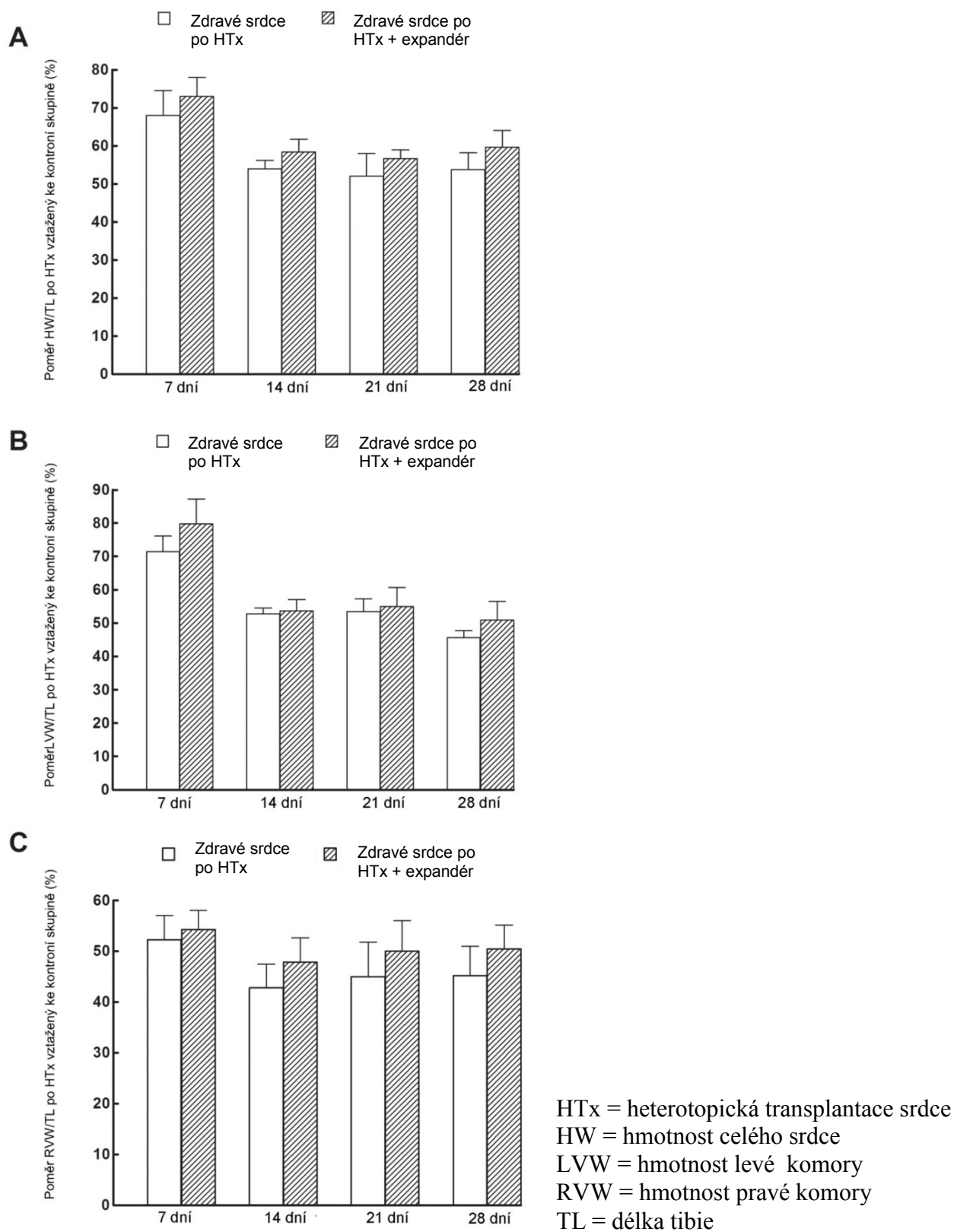
levé komory; RVW, hmotnost pravé komory; TL, délka tibie.

* P<0.05 vs. Lewis 10 týdnů od vytvoření ACF, # P<0.05 vs. Lewis 11 týdnů od vytvoření ACF,

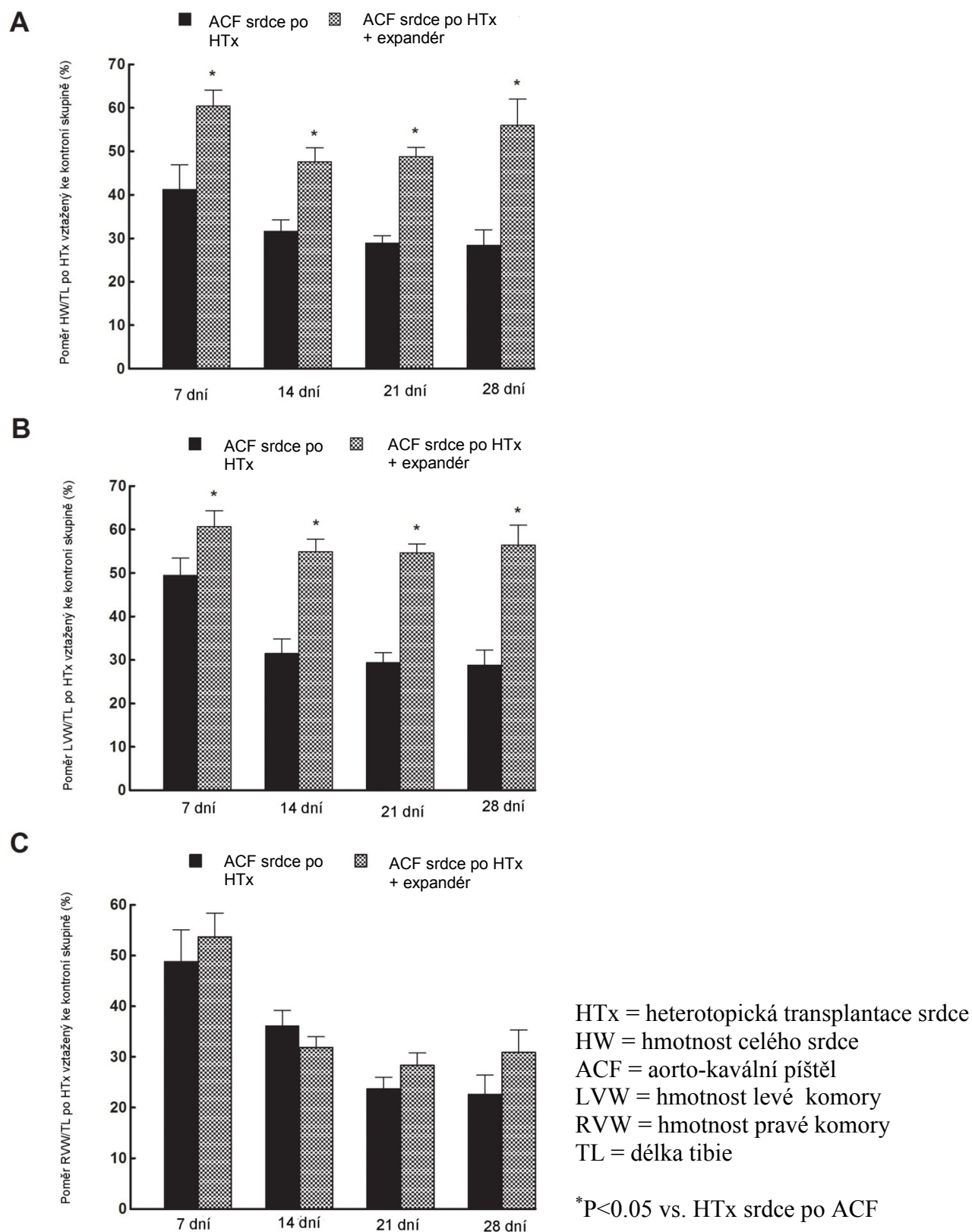
V předchozích studiích byl zaznamenán rozvoj srdeční atrofie již 7 dní po HTx zdravého i selhávajícího srdce.

Zvýšením izovolumické zátěže po implantaci trojramenného expandéru do dutiny levé komory nedochází ke statisticky významnému zmírnění úbytku hmotnosti heterotopicky transplantovaných zdravých srdcí. Po implantaci expandéru nedošlo k signifikantnímu zmírnění poklesu hmotnosti celého srdce, levé ani pravé komory (Graf 5. 1. A-C).

Navýšením izovolumické zátěže myokardu po implantaci trojramenného expandéru do dutiny levé komory srdce po navození srdečního selhání (ACF) dochází ke statisticky signifikantní redukci poklesu celkové hmotnosti heterotopicky transplantovaného srdce, ale také hmotnosti levé komory. Paralelně dochází také k redukci váhového úbytku pravé komory, tento rozdíl však není statisticky významný (Graf 5. 2. A-C).



Graf 5. 1. – Vliv implantace expandéru na rozvoj srdeční atrofie po HTx zdravého srdce.
 (A) změny hmotnosti celého srdce, (B) změny hmotnosti levé komory, (C) změny hmotnosti pravé komory



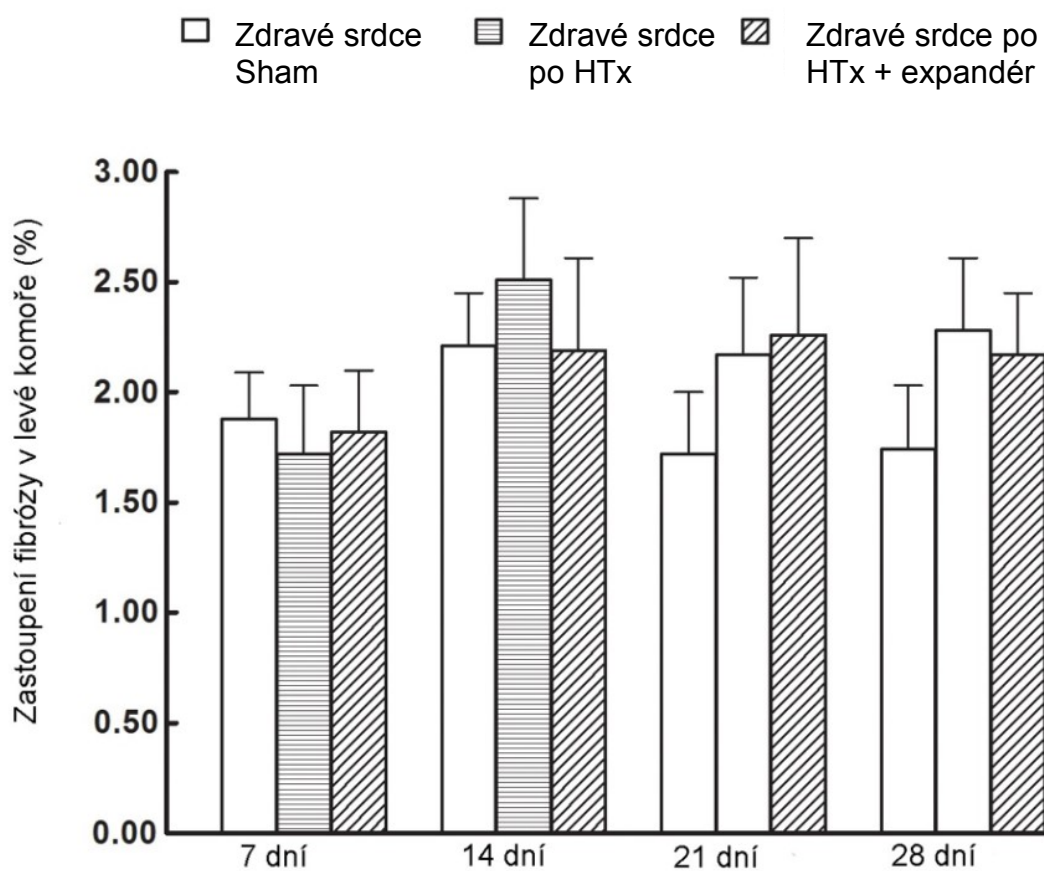
Graf 5. 2. – Vliv implantace expandéru na rozvoj srdeční atrofie po HTx selhávajícího srdce. (A) změny hmotnosti celého srdce, (B) změny hmotnosti levé komory, (C) změny hmotnosti pravé komory

Měřením zastoupení myokardiální fibrózy bylo zjištěno, že podíl fibrózy v levé komoře zdravého heterotopicky transplantovaného srdce se ve srovnání s kontrolou výrazně neliší. Implantace trojramenného expandéru nevedla ke změnám v rozsahu myokardiální fibrózy v levé komoře heterotopicky transplantovaných zdravých srdcí (Graf 5. 3.).

Obdobně jako u zdravého myokardu nedošlo po HTx selhávajícího srdce, ani následkem implantace expandéru, k významným změnám v zastoupení fibrózy ve svalovině levé komory transplantovaného selhávajícího srdce (Graf 5. 4.).

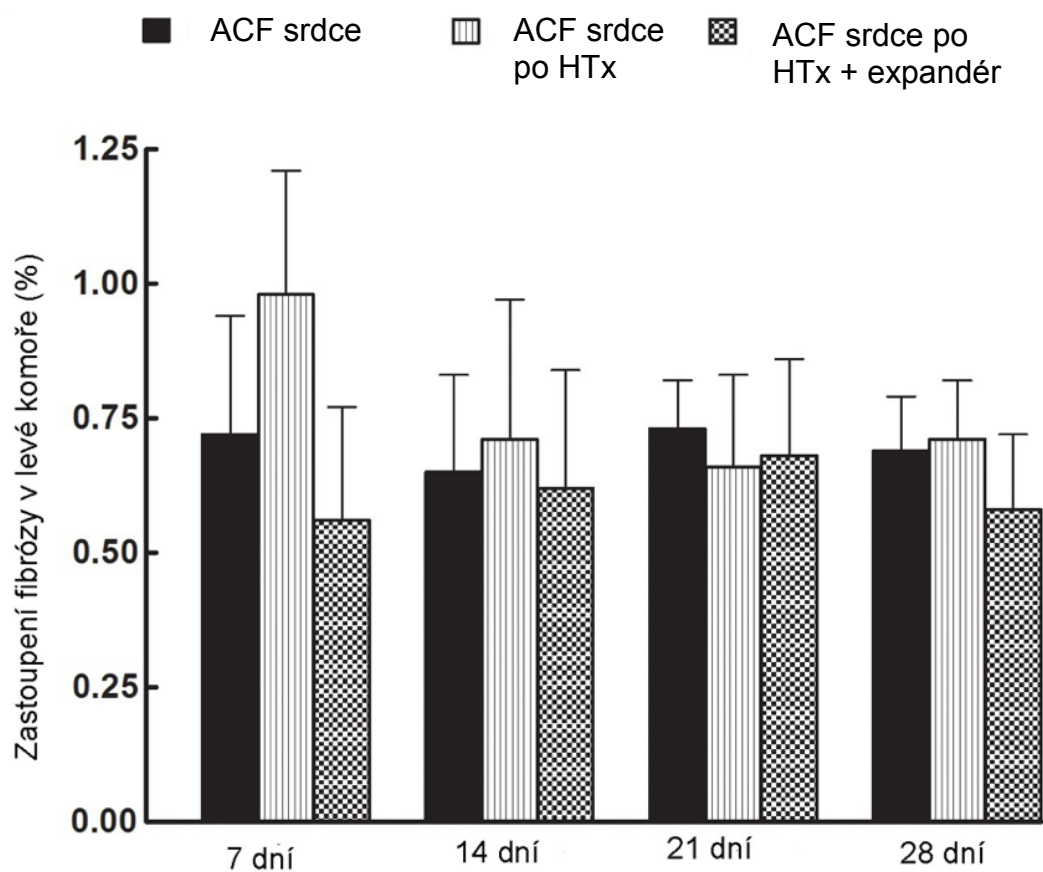
Následkem mechanického odlehčení myokardu po HTx dochází u zdravého srdce k rozvoji atrofie myokardu levé komory. Implantace trojramenného expandéru do dutiny levé komory nevedla ke statisticky významnému ovlivnění změny šířky kardiomyocytů (Graf 5. 5.).

Mechanické odlehčení v rámci HTx srdce po navození srdečního selhání vedlo k rozvoji výrazné atrofie kardiomyocytů selhávajícího myokardu. Implantací trojramenného expandéru došlo ke zmírnění poklesu šířky kardiomyocytů po HTx selhávajícího srdce (Graf 5. 6.).



HTx = heterotopická transplantace srdce

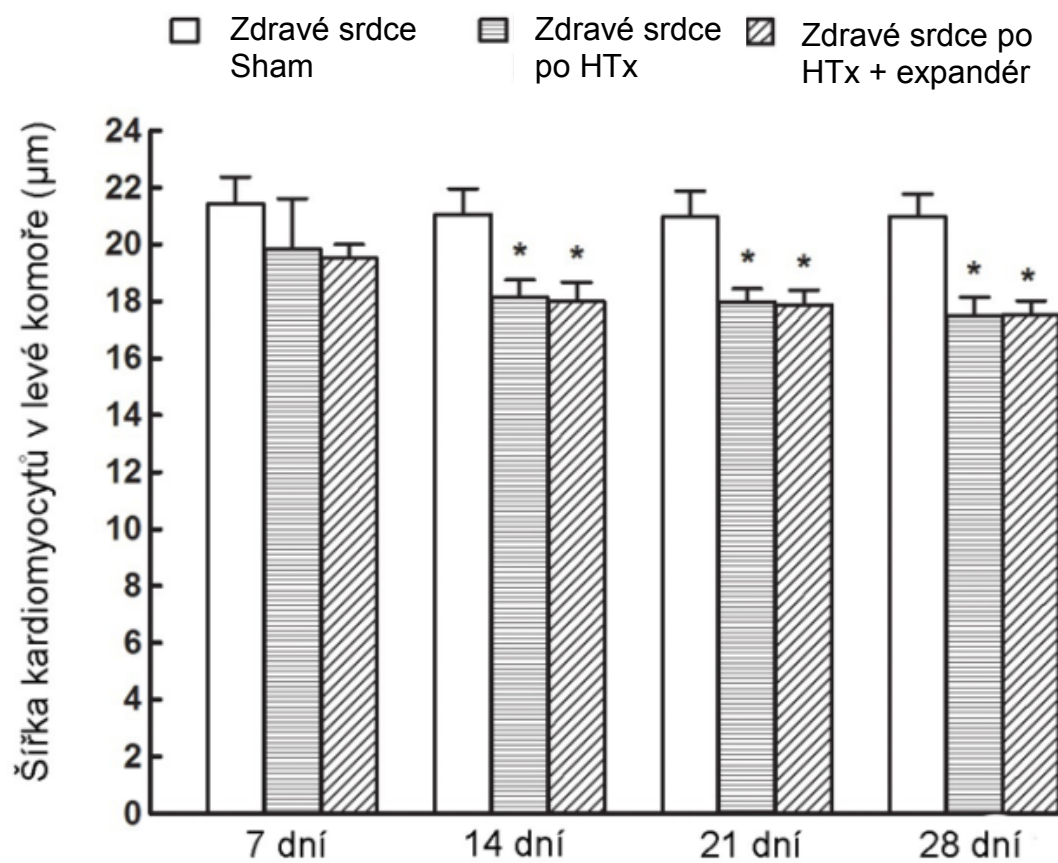
Graf 5. 3. – Vliv expandéru na rozsah myokardiální fibrózy v levé komoře po (HTx) zdravého srdce.



HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

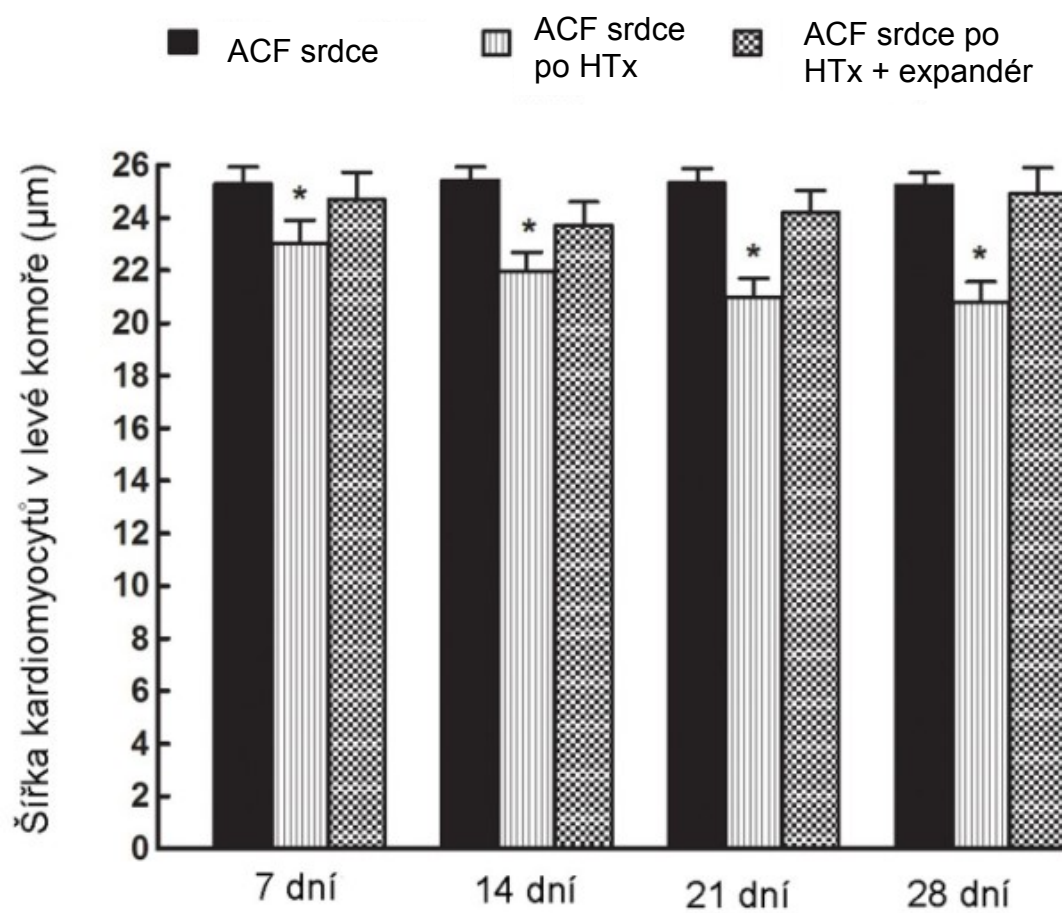
Graf 5. 4. – Vliv expandéru na zastoupení myokardiální fibrózy v levé komoře po HTx selhávajícího srdce.



HTx = heterotopická transplantace srdce

* $P < 0.05$ vs. nativní zdravé srdce

Graf 5. 5. – Vliv implantace expandéru po HTx zdravého srdce na absolutní šířku kardiomyocytů.



HTx = heterotopická transplantace srdce

ACF = aorto-kavální píštěl

* $P < 0.05$ vs. nativní srdce po založení ACF píštěle v

Graf 5. 6. – Vliv implantace expandéru na změny v šířce kardiomyocytů po HTx selhávajícího srdce.

5.5. Diskuze

Zvýšení izovolumické zátěže myokardu po implantaci trojramenného expandéru do dutiny levé komory nevedlo ke zmírnění rozvoje srdeční atrofie po HTx zdravého srdce. Naproti tomu vedla implantace trojramenného expandéru po HTx ACF srdce ke zmírnění atrofické remodelace myokardu. Toto tvrzení bylo podloženo nejen vážením hmotnosti celého srdce a jednotlivých srdečních kompartmentů, ale také posouzením změn šířky kardiomyocytů.

Skutečnost, že antiatrofický efekt expandéru se projevil signifikantně pouze u skupiny heterotopicky transplantovaných srdcí, poukazuje na rozdílné regulační mechanismy ve zdravém a selhávajícím myokardu. Ke zvýšení izovolumické zátěže myokardu pomocí trojramenného expandéru s cílem zmírnit rozvoj atrofické remodelace nás inspirovaly předchozí práce (Klein I., Hong C. et al., 1991).

V dřívějších experimentech bylo navýšení izovolumické zátěže před HTx srdce zajištěno implantací latexového balónku přes ústí mitrální chlopně do dutiny levé komory, který byl následně napuštěn 120 μ l fyziologického roztoku. Použití latexového balónku, které brání průtoku krve srdečními oddíly, by však bylo v klinické praxi neaplikovatelné. S cílem nalézt způsob, jakým by bylo možné navýšit izovolumickou zátěž myokardu, aniž by došlo k obstrukci dutiny levé komory, byl navržen a vyroben trojramenný expandér, který by poskytoval dostatečné navýšení izovolumické zátěže. Naše hypotéza předpokládala, že navýšením izovolumické zátěže myokardu dojde ke zmírnění atrofie vyvolané mechanickým odlehčením myokardu po HTx jak zdravého, tak selhávajícího srdce. Zjištění, že implantace expandéru do dutiny levé komory před HTx zdravého srdce nevedla ke statisticky významnému zmírnění atrofie, bylo překvapivé. Naproti tomu měla implantace expandéru do dutiny levé komory před HTx selhávajícího myokardu výrazný antiatrofický efekt. V současné době nejsme jednoznačně schopni vysvětlit divergenci

těchto zjištění, nicméně rozdílná reakce zdravého a selhávajícího myokardu na mechanické odlehčení se zdá být velmi pravděpodobná. Naše zjištění je v souladu s experimentální prací, kdy byl použit odlišný model srdečního selhání - toxická kardiomyopatie po podání doxorubicinu. Po HTx selhávajícího myokardu došlo k signifikantnímu zlepšení jeho kontraktility. Naproti tomu po HTx zdravého srdce došlo ke zhoršení jeho kontraktility (Takaseya T. et al., 2004).

Současná zjištění potvrdila naši hypotézu, že rozvoj srdeční atrofie následkem mechanického odlehčení myokardu představuje závažný nežádoucí jev doprovázející mechanické odlehčení myokardu, a to i přes řadu prokázaných molekulárních a ultrastrukturálních pozitivních efektů, které můžeme označit termínem reverzní remodelace myokardu. Zejména v klinické praxi může u pacientů léčených VAD právě rozvoj srdeční atrofie představovat zásadní překážku v cestě k zotavení myokardu s možností explantace VAD (Birks E. J. et al., 2013, Heckle M. R. et al., 2016). Naše výsledky dále potvrzují pozitivní efekt navýšení izovolumické zátěže selhávajícího myokardu na rozvoj nežádoucí atrofie myokardu po mechanickém odlehčení. Navyšování izovolumické zátěže mechanicky odlehčeného myokardu během terapie mechanickou srdeční podporou (např. nastavením čerpadla mechanické podpory) představuje velmi nadějnou možnost, jak ovlivnit rozvoj srdeční atrofie.

5.6. Souhrn výsledků

- A) Zvýšením izovolumické zátěže myokardu (implantace trojramenného expandéru do dutiny levé komory) lze ovlivnit průběh atrofické remodelace po HTx selhávajícího myokardu.
- B) Vliv implantace expandéru na průběh atrofické remodelace po HTx zdravého srdce nebyl statisticky významný.
- C) Implantace trojramenného expandéru do levé komory zdravého i selhávajícího srdce nevedla ke změnám v zastoupení myokardiální fibrózy.

6.Celkové shrnutí výsledků

- Naše výsledky potvrzují hypotézu, že již po krátké periodě mechanického odlehčení dochází v experimentálním modelu heterotopické transplantace srdce u laboratorního potkana k rozvoji myokardiální atrofie. Tato atrofie v klinické praxi představuje jednu ze zásadních překážek v cestě k zotavení myokardu v průběhu dlouhodobé léčby mechanickými srdečními podporami.
- Rozvoj myokardiální atrofie je výrazně akcentován po mechanickém odlehčení selhávajícího myokardu (aorto-kavální píštěl).
- Atrofická remodelace byla potvrzena v levé i pravé komoře heterotopicky transplantovaných srdcí jako změna hmotnosti jednotlivých srdečních oddílů a také jako změna absolutní šířky kardiomyocytů. Avšak nebylo pozorováno zmnožení vazivové tkáně po mechanickém odlehčení myokardu.
- Dietou navozené zvýšení myokardiálních koncentrací kyseliny palmitové, palmitoolejové a myristové nevedlo ke zmírnění rozvoje atrofie mechanicky odlehčených zdravých, ani selhávajících srdcí.
- Zvýšení izovolumické zátěže prostřednictvím trojramenného expendéru vedlo k signifikantní inhibici rozvoje srdeční atrofie, avšak pouze u heterotopicky transplantovaných srdcí po navození srdečního selhání.

7. Závěr

Naše výsledky potvrzují hypotézu, že již po krátké periodě mechanického odlehčení dochází, v experimentálním modelu heterotopické transplantace srdce, k rozvoji myokardiální atrofie. Naše výsledky rovněž podporují hypotézu, že rozvoj myokardiální atrofie je výrazně více akcentován po mechanickém odlehčení selhávajícího myokardu. Atrofická remodelace byla v naší práci dokumentována v levé i pravé komoře heterotopicky transplantovaných zdravých a selhávajících srdcí nejen změnou hmotnosti, ale také poklesem šířky kardiomyocytů. V žádné z experimentálních skupin nedošlo k signifikantnímu ovlivnění zastoupení myokardiální fibrózy.

Naše měření potvrzují hypotetický nárůst myokardiálních koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové po podávání vysokosacharóзовé diety. Naše data vyvracejí hypotézu o potenciálním zmírnění rozvoje atrofie po navýšení myokardiálních koncentrací kyselin palmitové, palmitoolejové a myristové během mechanického odlehčení srdce. Vysokosacharóзовá dieta nezpůsobila statisticky významné změny v trendu úbytku hmotnosti srdečních oddílů ani šířky kardiomyocytů po heterotopické transplantaci zdravého a selhávajícího myokardu.

Prokázali jsme zásadní úlohu zátěže myokardu v rozvoji atrofické remodelace. Zvýšení izovolumické zátěže, pomocí trojramenného expandéru, vedlo k signifikantní inhibici rozvoje srdeční atrofie u heterotopicky transplantovaných srdcí po navození srdečního selhání. Ve skupině heterotopicky transplantovaných selhávajících srdcí jsme dokumentovali významné zmírnění váhového úbytku a také zpomalení úbytku šířky kardiomyocytů následkem navýšení izovolumické zátěže. Ani ve skupinách po implantaci trojramenného expandéru jsme neprokázali signifikantní nárůst myokardiální fibrózy.

Rozvoj atrofické remodelace u pacientů dlouhodobě léčených mechanickými srdečními podporami představuje zásadní překážku v cestě k zotavení myokardu. Sledování rozvoje atrofických změn na experimentálním modelu heterotopické transplantace srdce společně s testováním možností ovlivnění atrofické remodelace přináší potenciálně prospěšná zjištění i pro klinickou praxi.

8.Literatura

1. ABBOTT CP, LINDSEY ES, CREECH O, DEWITT CW: A Technique for heart transplantation in the rat. *Arch Surg* **89**: 645-652, 1964.
2. AKUTSU T, KOLFF WJ: Permanent substitutes for valves and hearts. *ASAIO J* **4**:230-234, 1958.
3. ANDERSEN JB, ROURKE BC, CAIOZZOVJ, BENETT AF, HIKS JW: Physiology: postprandial cardiac hypertrophy in pythons. *Nature* **434**: 37-38, 2005.
4. BASKIN KB, TAEGTMEYER H: Taking pressure off the heart: The ins and outs of atrophic remodelling. *Cardiovasc Res* **90**: 243-250, 2011.
5. BENEŠ J, MELENOVSKÝ V, ŠKAROUPKOVÁ P et al.: Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload. *Anat Rec* **294**: 102-111, 2011.
6. BIRKS EJ: Molecular changes after left ventricular assist device support for heart failure. *Circ Res* **113**: 777-791, 2013.
7. BIRKS EJ, TANSLEY PD, HARDY J, et al: Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. *New Engl J Med* **355**: 1873-1884, 2006.
8. BIRKS EJ, GEORGE RS, HEDGER M, BAHRAMI T, WILTON P, BOWLES CHT, WEBB C, BOUGARD R, AMRANI R, YACIOUB MH, DREYFUS G, KHAGHANI A: Reversal of severe heart failure with a continuous-flow left ventricular assist device and pharmacological therapy: A prospective study. *Circulation* **123**: 381-390, 2011.
9. BLOOMEKATZ J, GALVEZ-SANTISTEBAN M, CHI NC: Myocardial plasticity: cardiac development, regeneration and disease. *Curr Opin Genet Dev* **40**: 120-130, 2016.
10. BRAUNWALD E: The war against heart failure. *Lancet* **385**: 812-824, 2015.
11. BRINKS H, GIRAUD MN, SEGISER A, FERRIÉ C, LONGNUS S, ULLRICH ND, KOCH WJ, MOST P, CARREL TP, TEVAERAI HT: Dynamic patterns of ventricular remodelling and apoptosis in hearts unloaded by heterotopic transplantation. *J Heart Lung Transplant* **33**: 203-210, 2014.
12. BRUGGINK AH, VAN OOSTERHOUT MFM, DE JOGE N, et al.: Reverse remodeling of the myocardial extracellular matrix after prolonged left ventricle assist device support follows a biphasic pattern. *J Heart Lung Transplant* **25**: 1091-1098, 2006.
13. CAHOVA M, DANKOVA H, PALENICKOVA E, PAPACKOVA Z, KAZDOVA L: The opposite effects of high-sucrose and high-fat diet on fatty acids oxidation and very low density lipoprotein secretion in rat model of metabolic syndrome. *J Nutr Metab* **2012**: 757205, 2012.
14. CALNE RY, ROLLES K, WHITE DJ, et al: Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* **2**:1033-36, 1979.

15. CAO DJ, JIANG N, BLAGG A, JOHNSTONE JL, GONDALIA R, OH M, LUO X, YANG KCH, SHELTON JM, ROTHERMEL BA, GILLETTE TG, DORN GW, HILL JA: Mechanical unloading activates FoxO3 to trigger Bnip3-dependent cardiomyocyte atrophy. *J Am Heart Assoc* **2**: e000016, 2013.
16. CARPENTIER A, LATRÉMOUILLE CH, CHOLLEY B, SMADJA DM, ROUSSEL JC, BOISSIER E, TROCHU JN, GUEFFET JP, et al.: First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: report of two cases. *Lancet* **386**: 1556-1563, 2015.
17. CORRY RJ, WINN HJ, RUSSELL PS: Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K antigens in rejection. *Transplantation* **16**: 343-350, 1973.
18. DANDEL M, WENG Y, SINIAWSKI H, STEPANENKO A, et al: Heart failure reversal by ventricular unloading in patients with chronic cardiomyopathy: Criteria for weaning from ventricular assist devices. *Eur Heart J* **32**: 1148-1160, 2011.
19. DEBAKEYE ME: The Odyssey of the artificial heart. *Artif Organs* **24**: 405-411, 2000.
20. DE BY TMMH, HOHACSI P, GAHL B, ZITTERMANN A, KRABATSCH T, GUSTAFSSON F, LEPRINCE P, MEYNS B, NETUKA I, et al.: The European Registry for Patients with Mechanical Circulatory Supports (EUROMAS) of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): second report. *Eur J Cardio-Thoracic Sur* **53**: 309-316, 2018.
21. DRAKOS SG, KFOURY AG, HAMMOND EH, REID BB, REVELO MP, RASMUSSEN BY, WHITEHEAD KJ, SALAMA ME, SELZMAN CH, STEHLIK J, CLAYSON SE, BRISTOW MR, RENLUND DG, LI DY: Impact of mechanical unloading on microvasculature and associated central remodeling features of the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* **56**: 382-391, 2010.
22. DRAKOS SG, KFOURY AG, STEHLÍK J, et al.: Bridge to recovery. Understanding the disconnect between clinical and biological outcomes. *Circulation* **126**: 230-241, 2012.
23. DRAKOS SG, MEHRA MR: Clinical myocardial recovery during long-term mechanical support in advanced heart failure: insights into moving the field forward. *J Heart Lung Transplant* **35**: 413-420, 2016.
24. DREYFUS G, JEBARA V, MIHAILEANU S, CARPENTIER A: Total orthotopic heart transplantation: an alternative to the standard technique. *Ann Thorac Surg* **52**: 1181, 1991.
25. DUNLAY SM, ROGER VL: Understanding the epidemic of heart failure: past, present and future. *Curr Heart Fail* **11**: 404-415, 2014.
26. ENOK S, LEITE GS, LEITE GA, GESSER H, HEDRICK MS, WANG T: Improved cardiac filling facilitates the postprandial elevation of stroke volume in *Python regius*. *J Exp Biol* **219**: 3009-3018, 2016.
27. FRAIZER OH, ROSE EA, MCCARTHY P, et al: Improved mortality and rehabilitation of transplant candidates treated with a long-term implantable left ventricular assist system. *Ann Surg* **222**: 327 - 336, 1995.
28. FU X, SEGISER A, CARREL TP, STAHEL T, MOST H: Rat heterotopic heart transplantation model to investigate unloading-induced myocardial remodeling. *Front Cardiovasc Med* **3**: 34, 2016. doi: 10.3389/fcvm.2016.00034

29. GALIANANES M, ZHAI X, HEARSE DJ: The effect of load on atrophy, myosin isoform shifts and contractile function: Studies in a novel rat heart transplant preparation. *J Mol Cell Cardiol* **27**: 407-417, 1995.
30. GARCIA R, DIEBOLD S: Simple, rapid, and effective method of producing aorto-caval shunts in the rat. *Cardiovasc Res* **24**: 430-432, 1990.
31. HECKLE MR, FLATT DM, SUN Y, et al.: Atrophied cardiomyocytes and their potential for rescue and recovery of ventricular function. *Heart Fail Rev* **21**: 191-198, 2016.
32. HELLERSTEIN HK, SANTIAGO-STEVENSON D: Atrophy of the heart: A correlative study of eighty-five proved cases. *Circulation* **1**: 93-126, 1950.
33. HO KK, ANDERSON KM, KANNEL WB, GROSSMAN W, LEVY D: Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* **88**: 107-115, 1993.
34. HUNT SA, ABRAHAM WT, CHIN MH, et al: ACC/AHA 2005 guidelines update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **112**:e154-e235, 2005.
35. CHAGGAR PS, WILIAMS SG, YONAN N, FILDES J, VENKATESWARAN R, SHAW SM: Myocardial recovery with mechanical circulatory support. *Eur J Heart Fail* **18**: 1220-1227, 2016.
36. CHAUDHRY SP, STEWART GC: Advanced heart failure prevalence, natural history and prognosis. *Heart Fail Clin* **12**: 323-333, 2016.
37. CHOO JJ, HORAN MA, LITTLE RA: Anabolic effects on skeletal muscle are mediated by beta2-adrenoceptor activation. *Am J Physiol* **263**: E50-E56, 1992.
38. JOHN R, LIAO K, LIETZ K, et al: Experience with the Levitronix CentriMag circulatory support system as a bridge to decision in patients with refractory acute cardiogenic shock and multisystem organ failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* **134**: 351-358, 2007.
39. KINOSHITA M, TAKANO H, TAENAKA Y, MORI H, TAKAICHI S, NODA H, TATSUMI E, YAGURA A, SEKII H, AKATSU T: Cardiac disuse atrophy during LVAD pumping. *ASAIO Trans* **34**: 208-212, 1988.
40. KINOSHITA M, TAKANO H, TAKAICHI S, TAENAKA Y, NAKATANI T: Influence of prolonged ventricular assistance on myocardial histopathology in intact heart. *Ann Thor Surg* **61**: 640-645, 1996.
41. KIRKLIN JK, PAGANI FD, KORMOS RL, STEVENSON LW, BLUME ED, et al.: Eight annual INTERMACS report: Special focus on framing the impact of adverse events. *J Heart Lung Transplant* **36(10)**: 1080-1086, 2017.
42. KLEIN I, SAMAREL AM, WELIKSON R, HONG C: Heterotopic cardiac transplantation decreases the capacity for rat myocardial protein synthesis. *Circ Res* **68**: 1100-1107, 1991.
43. KLEIN I, HONG C, SCHREIBER SS: Isovolumic loading prevents atrophy of the heterotopically transplanted rat heart. *Circ Res* **69**: 1421-1425, 1991.

44. KLEIN I, HONG C, SCHREIBER SS: Cardiac atrophy in the heterotopically transplanted rat heart: in vitro protein synthesis. *J Mol Cell Cardiol* **22**: 461-468, 1990.
45. KOLÁŘ F, PAPOUŠEK F, MACNAUGHTON C, PELOUCH V, MILEROVÁ M, KORECKÝ B: Myocardial fibrosis and right ventricular function of heterotopically transplanted hearts in rats treated with cyclosporine. *Mol Cell Biochem* **164**: 253-260, 1996.
46. KORECKÝ B, MASIKA M: Direct effect of increased hemodynamic load on cardiac mass. *Circ Res* **68**: 1174-1178, 1991.
47. LENZEN MJ, SCHOLTE OP REIMER WJ, BOERSMA E, et al.: Differences between patients with a preserved and a depressed left ventricular function: a report from the EuroHeart Failure Survey. *Eur Heart J* **25**: 1214-1220, 2004.
48. LIU Y, MAUREIRA P, BUCHERT R, et al.: Effect of chronic left ventricular unloading on myocardial remodeling: multimodal assesment of two heterotopic heart transplantation techniques. *J Heart Lung Transplant* **34**: 594-603, 2015.
49. LOSEFF SV, LUTZ RJ, MUDORF J, BARTH KH: Comparson of mechanical deformation properties of metallic stents with use of stress-strain analysis. *J Vasc Interv Radiol* **5**: 341-349, 1994.
50. MANN DL, BARGER PM, BURKHOFF D: Myocardial recovery and the failing heart. *J Am Coll Cardiol* **60**: 2465-2472, 2012.
51. MAYBAUM S, MANCINI D, XYDAS S, STARLING RC, AARONSON K, PAGANI FD, MILLER LW, MARGULIES K, MCREE S, FRAZIER OH, TORRE-AMIONE G: Cardiac improvement during mechanical circulatory support: A prospective multicenter study of the LVAD working group. *Circulation* **115**: 2497-2505, 2007.
52. MELENOVSKÝ V, ŠKAROUPKOVÁ P, BENEŠ J, TORRESOVÁ V, KOPKAN L, ČERVENKA L: The course of heart failure development and mortality in rats with volume overload due to aorto-caval fistula. *Kidney Blood Press Res* **35**: 167-173, 2012.
53. MIZUNO T, WEISEL RD, LI RK: Reloading the heart: A new animal model of left ventricular assist device removal. *J Thorac Cardiovasc Surg* **130**: 99-106, 2005.
54. MOSTERD A, COST B, HOES AW, et al.: The prognosis of heart failure in the general population. *Eur Heart J* **22**: 1318-1327, 2001.
55. MURANAKA H, MARUI A, TSUKASHITA M, WANG J, NAKANO J, IKEDA T, SAKATA R: Prolonged mechanical unloading preserves myocardial contractility but impairs relaxation in rat heart of dilated cardiomyopathy accompanied by myocardial stiffness and apoptosis. *J Thor Cardiovasc Surg* **140**: 916-922, 2010.
56. NETUKA I, IVÁK P, TUČANOVÁ Z, GREGOR S, SZÁRSZOI O, SOOD P, CRANDALL D, RIMSANS J, CONNORS JM, MEHRA MR: Evaluation of low-intensity anti-coagulation with a fully magnetically levitated centrifugal-flow circulatory pump-the MAGENTUM 1 study. *J Heart Lung Transplant* **37**: 579-586, 2018.
57. NETUKA I, MALÝ J, SZÁRSZOI O: Mechanické srdeční podpory v terapii terminálního srdečního selhání. *Cor Vasa* **50**: 207-214, 2008.

58. OLIVER-DUSSAULT C, ASCAH A, MARCIL M, et al.: Early predictors of cardiac decompensation in experimental volume overload. *Mol Cell Biochem* **338**: 271-281, 2010.
59. ONO K, LINDSEY ES: Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* **57**(2) :225-229, 1969.
60. ORIYANHAN W, TSUNEYOSHI H, NISHINA T, MATSUOKA S, IKEDA T, KOMEDA M: Determination of optimal duration of mechanical unloading for failing hearts to achieve bridge to recovery in a rat heterotopic heart transplantation model. *J Heart Lung Transplant* **26**: 16-23, 2007.
61. PATEL S, NICHOLSON L, CASSIDY CJ, WONG KY: Left ventricular assist device: a bridge to transplant or destination therapy?. *Posgrad Med J*. **92**: 271-281, 2016.
62. PERHONEN MA, FRANCO F, LANE LD, BUCKEY JC, BLOMQVIST CG, ZERWEKH JE, PESHOCK RM, WEATHERALL PT, LEVINE BD: Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. *J Appl Physiol* **91**: 645-653, 2001.
63. PETROU M, WYNNE DG, BOHELER KR, YACOUB MH: Clenbuterol induces hypertrophy of the latissimus dorsi muscle and heart in the rat with molecular and phenotypic changes. *Circulation* **92**: 483-489, 1995.
64. POKORNÝ M, ČERVENKA L, NETUKA I, PIRK J, KOŇAŘÍK M, MALÝ J: Ventricular assist devices in heart failure: how to support the heart but prevent atrophy?. *Phys Res* **63**: 147-156, 2014.
65. PONIKOWSKI P, VOORS AA, ANKER SD, BUENO H, et al.: 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* **37**: 2129-2200, 2016.
66. RAKUŠAN K, HERON MI, KOLÁŘ F, KORECKÝ B: Transplantation-induced atrophy of normal and hypertrophic rat hearts: Effect on cardiac myocytes and capillaries. *J Mol Cell Cardiol* **29**: 1045-1054, 1997.
67. RAZEGHI P, SHARMA S, YING J, LI Y, STEPKOWSKI S, REID MB, TAEGTMEYER H: Atrophic remodeling of the heart in vivo simultaneously activates pathways of protein synthesis and degradation. *Circulation* **108**: 2536-2541, 2003.
68. RAZEGHI P, TAEGTMEYER H: Hypertrophy and atrophy of the heart. The other side of remodeling. *Ann N Y Acad Sci* **1080**: 110-119, 2006.
69. RAZEGHI P, VOLPINI KC, WANG M, YOUKER KA, STEPKOWSKI S, TAEGTMEYER H: Mechanical unloading of the heart activates the calpain system. *J Mol Cell Cardiol* **42**: 449-452, 2007.
70. RIQUELME CA, MADIGA JA, HARRISON BC, WALL CE, et al.: Fatty acids identified in the Burmese python promote beneficial cardiac growth. *Science* **334**: 528-531, 2011.

72. RODRIGUE-WAY A, BURHOF D, GEESAMAN BJ, GOLDEN S, XU J, POLLMAN MJ, DONOGHUE M, JEYASEELAN R, et al.: Sarcomeric genes involved in reverse remodelnig of the heart during left ventricular assist device support. *Heart Lung Transplant* **24**: 73-80, 2005.
73. SAVARESE G, LUND LH: Global public health burden of heart failure. *Cardiac Failure Review* **3**: 7-11, 2017.
74. SECOR SM, DIAMOND J: Adaptive response to feeding in Burmese pythons: pay before pumping. *J Exp Biol* **198**: 1313-1325, 1995.
75. SHUMWAY KE, LOWER RR, STOFER RC: Transplantation of the heart. *Adv Surg* **2**: 265-84, 1966.
76. SLAY CE, ENOK S, HICKS JW, WANG T: Reduction of blood oxygen levels enhances postprandial cardiac hypertrophy in Burmose python (*Python bivittatus*). *J Exp Biol* **217**: 1784-1789, 2014.
77. SOPPA GKR, BARTON PJR, TERRACCIANO CMN, YACOUN MH: Left ventricle assist device-induced molecular changes in the failing myocardium. *Curr Opin Cardiol* **23**: 206-218, 2008.
78. TAKASEYA T, ISHIMATSU M, TAYAMA E, NISHI A, AKASU T, AOYAGI S: Mechanical unloading improves intracellular Ca²⁺ regulation in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **44**: 2239-2246, 2004.
79. THOMPSON EW, MARINO TA, UBOH E, KENT RL, COOPER G: Atropy reversal and cardiocyte redifferentiation in reloaded cat myocardium. *Circ Res* **54**: 367-377, 1984.
80. TSUNEYOSHI H, ORIYANHAN W, KANEMITSU H, SHIINA R, NISHINA T, IKEDA T, NISHIMURA K, KOMEDA M: Heterotopic transplantation of the failing rat hearts a model of left ventricular mechanical unloading towards recovery. *ASAIO J* **51**: 116-120, 2005.
81. WILLIS MS, ROJAS M, LI L, SELZMAN CH, TANG R, STANSFIELD WE, RODRIGUEZ JE, GLASS DJ, PATTERSON C: Muscle ring finger 1 mediates cardiac atrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**: 997-1006, 2009.
82. WILSON SR, GIVERTZ MM, STEWART GC, MUDGE GH: Ventricular assist devices the challenges of outpatient management. *J Am Col Cardiol* **54**: 1647-1659, 2009.
83. YIN FCP, SPURGEON HA, RAKUŠAN K, WEISFELDT ML, LAKATTA EG: Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* **243**: H941-H947, 1982.
84. ZIMPFER D, ZRUNEK P, SANDERS S, et al: Post-transplant survival after lowering fixed pulmonary hypertension using left ventricular assist devices. *Eur J Cardiovasc Surg* **31**: 698-702, 2007.

9. Publikace

Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace

POKORNÝ M, ČERVENKA L, NETUKA I, PIRK J, KOŇAŘÍK M, MALÝ J: Ventricular assist devices in heart failure: how to support the heart but prevent atrophy?. *Phys Res* **63**: 147-156, 2014.
(IF 1,487)

POKORNÝ M, MRÁZOVÁ I, MALÝ J, PIRK J, NETUKA I, VAŇOURKOVÁ Z, DOLEŽELOVÁ Š, ČERVENKOVÁ L, MAXOVÁ H, MELENOVSKÝ V, ŠOCHMAN J, SADOWSKI J, ČERVENKA L: Effects of increased myocardial tissue concentration of myristic, palmitic and palmitoleic acids on the course of cardiac atrophy of the failing heart unloaded by heterotopic transplantation. *Phys Res* **67**: 13-30, 2018.
(IF 1,461)

POKORNÝ M, MRÁZOVÁ I, ŠOCHMAN J, MELENOVSKÝ V, MALÝ J, PIRK J, ČERVENKOVÁ L, SADOWSKI J, ČERMÁK Z, VOLENEC K, VACKOVÁ Š, MAXOVÁ H, ČERVENKA L, NETUKA I: Isovolumic loading of the failing heart by intraventricular placement of a spring expander attenuates cardiac atrophy after heterotopic heart transplantation. *Biosci Rep* 2018. doi: 10.1042/BSR20180371
(IF 2,906)

Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace

IVÁK P, PÍTHA J, WOHLFAHRT P, KRÁLOVÁ LESNÁ I, STÁVEK P, DORAZILOVÁ Z, ŠTĚPÁNKOVÁ J, MALÝ J, **POKORNÝ M**, NETUKA I: Endothelial dysfunction expressed as endothelial microparticles in patients with end-stage heart failure. *Phys Res* **63 Suppl 3**: S369-373, 2014.
(IF 1,461)

MALÝ J, SZÁSZOI O, DORAZILOVÁ Z, BEŠÍK J, **POKORNÝ M**, KOTULÁK T, NETUKA I: Case report: atypical fungal obstruction of the left ventricular assist device outflow cannula. *J Cardiothorac Surg* 2014. doi: 10.1186/1749-8090-9-40.
(IF 1,028)

KOŇAŘÍK M, **POKORNÝ M**, PIRK J, NETUKA I, SZÁRSZOI O, MALÝ J: New modalities of surgical treatment for postinfarction left ventricular free wall rupture: A case report and literature review. *Cor et Vasa* **57**: e359-361, 2015.

Kapitoly v monografiích

POKORNÝ M, MRÁZOVÁ I, MALÝ J. Heterotopic Abdominal Heart Transplantation in Rats. In: Girman P, Kříž J, Baláž, et al.: *Rat Experimental Transplantation Surgery a Practical Guide*. 1. vyd. Dordrecht: Springer, 2015, s. 85-110. ISBN 978-3-319-14558-7.